

MARIA GABRIELA PEREIRA DOS SANTOS

**Regulação da biogênese de microRNAs
por proteínas hnRNPs**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

MARIA GABRIELA PEREIRA DOS SANTOS

**Regulação da biogênese de microRNAs
por proteínas hnRNPs**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pereira Coltri

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Dos Santos, Maria Gabriela Pereira
Regulação da biogênese de microRNAs por proteínas
hnRNPs / Maria Gabriela Pereira Dos Santos;
orientadora Patricia Pereira Coltri. -- São Paulo,
2019.
68 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. RNA. 2. Splicing. 3. Proteínas hnRNPs. 4.
microRNAs. 5. miR-17-92. I. Coltri, Patricia
Pereira, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Gabriela Pereira dos Santos

Título da Dissertação/Tese: Regulação da biogênese de microRNAs por proteínas hnRNPs

Orientador: Profa. Dra. Patricia Pereira Coltri

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

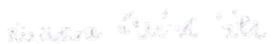


Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **946/2018** referente ao projeto intitulado: "**Regulação do splicing de microRNAs por proteínas hnRNP**" sob a responsabilidade de **Maria Gabriela Pereira dos Santos** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Patricia Pereira Coltri**, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 21 de março de 2018.


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP


Prof. Dra. **Camila Squarzoní Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Para a minha família e
amigos.

Agradecimentos

Creio que esta seja a parte mais árdua de se escrever. Não que o ato de agradecer seja difícil, mas pela certeza de ainda sim, ao fazê-lo, não será suficiente.

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre estar presente, e sempre me guiar e me proteger, e mesmo nos momentos de teimosia e revolta, nunca me abandonar. Agradeço por Ele ter me mostrado que, impreterivelmente, Ele é um melhor planejador do que eu.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Patricia Pereira Coltri, por ter confiado em mim, e por todas as portas que direta e indiretamente ela me abriu, ao me aceitar em seu laboratório. Sou grata por toda a atenção, cuidado, por sempre se lembrar de mim ao ver algo que ela julgou ser de meu interesse, por todo o incentivo, e pelos puxões de orelha, que com toda certeza, foram muito importantes. Obrigada pela oportunidade.

Agradeço imensamente aos meus pais Tarcisio e Elisabete, por sempre estarem presentes em cada fase da minha vida. Sem o apoio, o incentivo e até mesmo o “você vai sim, pois não criamos filhos para desistir”, eu provavelmente sequer teria começado. Vocês são exemplos para mim, e para os meus irmãos, e apesar de não ter sido uma missão fácil, vocês me ensinaram o que verdadeiramente tem valor. Obrigada.

Agradeço aos meus irmãos, Lucas, Junior e Jonas, e a minha cunhada Amanda, que dos jeitos mais improváveis e aleatórios, me incentivaram e me apoiaram. Posso dizer que vocês não são do tipo “bonzinhos”, mas eu também não sou, e creio que seja isso que sempre permitiu que tivéssemos um relacionamento tão valioso e extraordinário. Obrigada, meninos.

Agradeço aos meus amigos, por todo cuidado, carinho e apoio, e por me ensinarem que a “amizade é uma questão de ser, e não de estar”. Em especial à Cris, Gustavo e Thae. Obrigada.

Sou muito grata aos colegas de laboratório (por ordem alfabética, para não demonstrar predileção): Arthur, Gisela Guilherme, Helder, Hilan, Vivian e Yasmin. Agradeço pelo apoio nos experimentos e técnicas, prévias de apresentações, por

me “tolerarem”, e por sempre sonharem os meus sonhos e aspirações juntamente comigo. E certamente, obrigada pelas risadas e pelo suporte, principalmente nos dias nos quais “as leis de Murphy” pareciam ter se abrigado em nosso laboratório. Obrigada.

Às professoras Dra. Dânia Emi Hamassaki, Dra. Edna Kimura, Dra. Lucia Rossetti Lopes, Dra. Marinilce Fagundes dos Santos e Dra. Vanessa Freitas por disponibilizarem seus laboratórios e equipamentos. Obrigada.

Aos meus colegas do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, agradeço por toda a ajuda, amizade, e por serem sempre serem proativos. Agradeço especialmente à Camila, Fernanda e ao Simon. Obrigada.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento da minha dissertação de mestrado.

Por fim, agradeço a CAPES, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“São nossas escolhas que mostram o que realmente somos, muito mais do que
nossas habilidades.”

J.K. Rowling

RESUMO

DOS SANTOS, M.G.P. **Regulação da biogênese de microRNAs por proteínas hnRNPs**. 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O *splicing* é um processo crítico para expressão gênica em eucariotos, pois os genes são transcritos como pré-mRNAs, os quais são compostos por *exons* (sequências que permanecem nos mRNAs maduros) e *introns* (sequências intermediárias). O processo de *splicing* envolve a excisão de *introns* e a ligação de *exons*, resultando em transcritos maduros (mRNA). Este processo é realizado por uma maquinaria complexa chamada spliceossomo, que é composta por cinco pequenos RNAs associados a proteínas (snRNAs) e mais de 100 proteínas, sendo que algumas podem associar-se transitoriamente a componentes de spliceossomo ou aos pré-mRNAs. As hnRNPs são proteínas que podem associar-se ao complexo spliceossomo, desempenhando um papel regulador nos locais de *splicing* e frequentemente envolvidas na mediação de *splicing* alternativo. No genoma humano, mais de 70% dos miRNAs estão localizados em *introns*, portanto, é possível que o processo de *splicing* seja importante para sua maturação. O aumento da expressão do *cluster* de miRNAs *miR-17-92* já foi relacionado ao desenvolvimento de muitas patologias, como câncer de tireoide, câncer de pulmão e linfoma. Estudos anteriores mostraram que a hnRNP A1 é importante para a maturação de do *miR-18a*. Neste trabalho nós investigamos a potencial associação das proteínas hnRNP A1 e hnRNP G aos miRNAs do *cluster miR-17-92*. Os resultados mostraram que a hnRNP A1 está associada a outros membros do *cluster miR-17-92*, e que a superexpressão dessa proteína aumenta as capacidades proliferativa, migratória e invasiva em células de câncer papilífero de tireóide, BCPAP.

Palavras-chave: RNA. Splicing. Proteínas hnRNPs. MicroRNAs. *MiR-17-92*.

ABSTRACT

DOS SANTOS, M.G.P. **Regulation of microRNAs biogenesis by hnRNP proteins.** 2019. 68 p. Master thesis (Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Splicing is a critical process for gene expression in eukaryotes, as genes are transcribed as pre-mRNAs, which are composed of exons (sequences that remain in mature mRNAs) and introns (intermediate sequences). The splicing process involves intron excision and junction of exons, resulting in mature transcripts (mRNA). This process is performed by a complex machinery called spliceosome, which is composed by five snRNAs and more than 100 proteins, some of which may transiently associate with spliceosome components or pre-mRNAs. HnRNPs are proteins that can associate with the spliceosome complex, playing a regulatory role at splicing sites and often involved in alternative splicing mediation. In the human genome, over 70% of miRNAs are located in introns, therefore, it is possible that the splicing process is important for their maturation. Increased *miR-17-92* cluster expression levels have been related to the development of many pathologies, such as thyroid cancer, lung cancer and lymphoma. Previous studies have shown that hnRNP A1 is important for *miR-18a* maturation. We investigated the potential association of hnRNP A1 and hnRNP G proteins with miRNAs from the *miR-17-92* cluster. The results showed that hnRNP A1 is associated with other members of the *miR-17-92* cluster, and that overexpression of this protein increases the proliferative, migratory and invasive capabilities of papillary thyroid cancer cells, BCPAP.

Keywords: RNA. Splicing. HnRNPs proteins. MicroRNAs. *MiR-17-92*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
BCPAP	Linhagem tumoral
BSA	Do inglês <i>Bovine serum albumin</i>
cDNA	DNA complementar
CT	Do inglês <i>cycle threshold</i>
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DP	Desvio padrão
DTT	Do inglês <i>dithiothreitol</i>
kDa	Kilodalton
hnRNP	Do inglês <i>heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>
MAPT	Proteína Tau associada aos microtúbulos
miRNA	MicroRNA
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Do inglês <i>mammalian target of rapamycin</i>
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PTEN	Fosfatase e tensina homóloga
RBP	Do inglês <i>RNA binding protein</i>
RRM	Do inglês <i>RNA-recognition motif</i>
RISC	Do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNU6B	RNA nuclear 6 b
SEM	Do inglês <i>standard error of the mean</i>
siRNA	Do inglês <i>small interfering RNA</i>
snRNA	Do inglês <i>small nuclear RNA</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de <i>splicing</i>	14
Figura 2. Representação da associação entre hnRNP A1 e pri-miR-18a	19
Figura 3. Processamento de miRNAs	21
Figura 4. Representação esquemática da estrutura secundária do pri-miR-17-92...	23
Figura 5. Representação esquemática do pré-RNA do gene MIR17HG.....	31
Figura 6. Confirmação da superexpressão de hnRNP A1.....	32
Figura 7. Análise da expressão dos miRNAs	33
Figura 8. Análise dos níveis de miRNA associados ao FLAG-hnRNP A1.....	34
Figura 9. Análise <i>in silico</i>	35
Figura 10. Ensaio de proliferação.....	36
Figura 11. Ensaio de ferida.....	37
Figura 12. Ensaio de <i>transwell</i>	39
Figura 13. Ensaio de viabilidade.....	40
Figura 14. Perfis de ciclo celular.....	41
Figura 15. <i>Knockdown</i> de hnRNP A1.....	42
Figura 16. Regulação do <i>splicing</i> de MIR17HG.	45
Figura 17. Clonagem de hnRNP G em vetor pFLAG	46
Figura 18. Confirmação da superexpressão de hnRNP G	47
Figura 19. Análise <i>in silico</i>	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 <i>Splicing</i>	12
1.1.1 <i>Splicing</i> alternativo.....	14
1.2 <i>Proteínas hnRNP</i>	16
1.2.1 hnRNP G.....	17
1.2.2 hnRNP A1.....	18
1.3 <i>miRNAs</i>	20
1.4 <i>MiR-17-92</i>	22
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 <i>Objetivo geral</i>	24
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	24
3 METODOLOGIA.....	25
3.1 <i>Clonagem e obtenção de vetores de superexpressão</i>	25
3.2 <i>Cultura de células e transfecção</i>	26
3.3 <i>Curvas de crescimento</i>	27
3.4 <i>Ensaio de migração e invasão</i>	27
3.5 <i>Viabilidade celular</i>	28
3.6 <i>Análise do ciclo celular com iodeto de propídio</i>	28
3.7 <i>Imunoprecipitação</i>	29
3.8 <i>Extração de RNA total e síntese de cDNA</i>	29
3.9 <i>PCR quantitativo em tempo real</i>	30
3.10 <i>Silenciamento de hnRNP A1</i>	30
3.11 <i>Regulação do splicing de MIR17HG</i>	30
3.12 <i>Análises estatísticas</i>	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 <i>Confirmação da superexpressão de hnRNP A1 e varredura dos miRNAs</i>	32
4.2 <i>Imunoprecipitação de hnRNP A1 e associação ao cluster miR-17-92</i>	33
4.3 <i>Análise in silico da interação entre hnRNP A1 e o cluster miR-17-92</i>	34
4.4 <i>Células superexpressando hnRNP A1 possuem maior índice proliferativo</i>	35

4.5 Células superexpressando hnRNP A1 possuem capacidades migratória e invasiva maiores	36
4.6 Ensaio de ciclo celular	40
4.7 Knockdown da proteína hnRNP A1	41
4.8 Regulação do splicing de MIR17HG	43
4.9 Construção do vetor para superexpressão de hnRNP G	45
4.10 Confirmação de superexpressão de hnRNP G	46
4.11 Análise <i>in silico</i> da interação entre hnRNP G e o cluster miR-17-92	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES	52
7 PERSPECTIVAS	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Splicing

Em eucariotos a grande maioria dos genes é composta por sequências codificadoras, os *exons*, separadas por sequências intermediárias denominadas *introns*. Ainda durante sua transcrição no núcleo, os precursores de RNAs (pré-RNAs) são processados para remoção dos *introns* e união dos *exons*, um processo denominado *splicing*, gerando sequências de RNAs maduras, prontas para serem traduzidas. As diversas reações necessárias para que os *introns* dos pré-mRNAs sejam removidos são catalisadas por uma grande maquinaria ribonucleoproteica (RNP), chamada spliceossomo (Lee, Wang and Rio 2018; Hoskins and Moore 2012). O spliceossomo é composto por 5 pequenos RNAs nucleares associados a proteínas (snRNPs), denominados U1, U2, U4, U5 e U6, e por mais de 150 outras proteínas. O spliceossomo atua por meio de interação com sítios conservados localizados nas fronteiras entre *introns* e *exons*, e principalmente por sítios contidos em *introns* (Will and Luhrmann 2011).

Durante o processo de *splicing*, primeiramente ocorre o reconhecimento do snRNP U1 ao sítio de *splicing* (figura 1) localizado na extremidade 5' do *intron* (sequência consenso GUAUGU). Em seguida, ocorre a ligação do snRNP U2 ao sítio de ramificação (*branchpoint*) no *intron* (sequência consenso UACUAAC), ocorrendo o recrutamento dos snRNPs U4/U6-U5. A partir disso há diversos rearranjos que promovem a dissociação dos snRNPs U1 e U4, formando um complexo catalítico capaz de mediar 2 reações consecutivas de transesterificação, sendo a primeira responsável pela liberação do *exon* 5', e a segunda pela junção dos *exons* e liberação do laço intrônico (Staley and Guthrie 1998; Vigevani et al. 2017).

O spliceossomo é montado *de novo* a cada novo *intron*, tornando assim o processo de *splicing* extremamente dinâmico. Importante ressaltar que a composição da maquinaria varia a cada etapa do processo, o que conseqüentemente requer uma grande disponibilidade de snRNPs livres e prontos para serem recrutados de acordo com a demanda. Com isso, a quantidade de cada complexo integrante do spliceossomo é altamente dependente da taxa de reciclagem dos snRNPs (Fourmann et al. 2013). Paralelamente a isso, os *introns*,

por sua vez, podem ser direcionados para degradação no final do processo, mas cada vez mais estudos mostram que muitos RNAs não codificadores estão contidos nestes *introns*, e, portanto, é possível que uma grande parte deles seja processada (Westholm and Lai 2011). A proteína DRB1 é uma importante peça para a reciclagem dos snRNPs, além de auxiliar na linearização do laço intrônico, possibilitando assim o processamento de *introns*. Baixos níveis de DRB1 levam a menores taxas de reciclagem de alguns snRNPs, refletindo na disponibilidade dos complexos do spliceossomo, sugerindo assim que essa proteína possui um papel regulatório (Han, Tang and Smith 2010).

Algumas proteínas envolvidas no processamento de RNA, como SF3A1, PRPF8 e PRPF19, e aproximadamente dez RNA helicases, como a SNRNP200, participam da formação do spliceossomo (Jurica and Moore 2003; Meyer and Vilardeell 2009). A SNRNP200 promove importante interação do snRNA U5 com os outros componentes associados ao snRNP U5. Esta proteína está associada aos processos de formação do núcleo catalítico do spliceossomo, e também à desmontagem e reciclagem do complexo (Absmeier, Santos and Wahl 2016; Zhang et al. 2015). A PRPF8 regula a atividade da RNA helicase SNRNP200 (Grainger and Beggs 2005). Mutações na região reguladora de PRPF8 estão ligadas ao desenvolvimento de retinite pigmentosa (Boon-Unge et al. 2007; Hoskins and Moore 2012; Mayerle and Guthrie 2016).

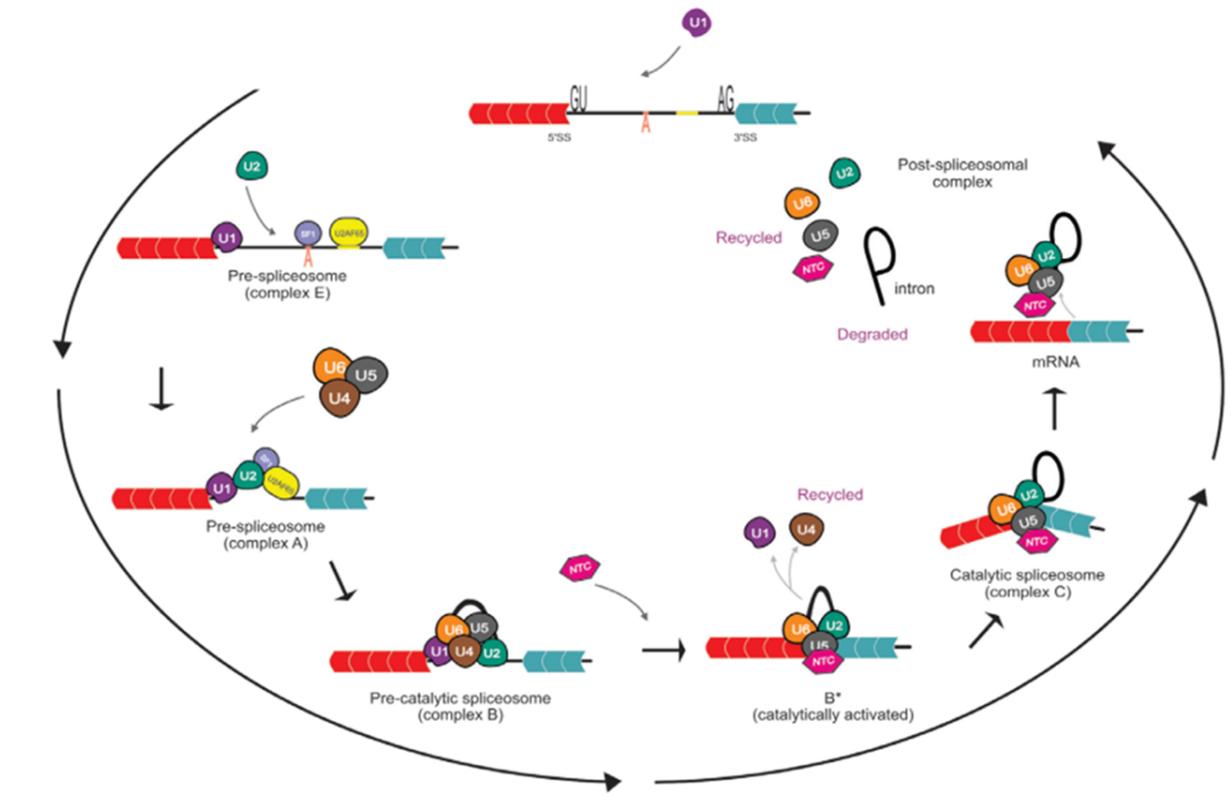


Figura 1. Processo de *splicing*. Representação esquemática do processo de *splicing* e a montagem dos complexos do spliceossomo. Na parte superior destacam-se os sítios de *splicing* presentes nos pré-mRNA, localizados nas regiões 5', 3' e sítio de ramificação, e que são conservados. A montagem do spliceossomo ocorre a partir do reconhecimento destes sítios pelas snRNPs (como descrito em 1.1), e após diversos rearranjos, há a formação do complexo C do spliceossomo, onde ocorrem as duas reações de transesterificação, culminando na excisão do *intron* e junção dos *exons* (Adaptado de Coltri, Dos Santos and da Silva 2019).

1.1.1 *Splicing* alternativo

A regulação do processo de *splicing* já foi associada à presença de proteínas que atuam de forma transitória no complexo. O *splicing* alternativo é um mecanismo pelo qual uma molécula de pré-RNA pode dar origem a diferentes RNAs maduros, através da remoção ou inclusão de *exons*, sendo essas novas moléculas conhecidas como transcritos alternativos ou isoformas. Cerca de 85% dos genes em eucariotos são submetidos ao *splicing* alternativo (Carazo, Romero and Rubio 2019; Chen and Weiss 2015; Nilsen and Graveley 2010).

O uso de sítios alternativos de *splicing* depende de regulação, muitas vezes executada por proteínas associadas a sequências regulatórias presentes nos pré-

mRNAs. Algumas das sequências regulatórias estão presentes nos *exons*, como os ESE (*exonic splicing enhancer*) e ESS (*exonic splicing silencer*), e outras estão contidas em *introns*, como os ISE (*intronic splicing enhancer*) e ISS (*intronic splicing silencer*). Algumas famílias de proteínas, como as hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) e proteínas SR (*serine-arginine rich*), são frequentemente associadas a tais sequências (Coltri et al. 2019). É possível obter-se transcritos alternativos e distintos dependendo da condição da célula, ou da etapa de desenvolvimento do organismo (Vigevani et al. 2017). A atuação das proteínas que modulam o *splicing* pode ainda interferir diretamente nas interações entre os componentes do spliceossomo e os RNAs (Han et al. 2010). Mutações nos sítios de *splicing* podem levar ao desenvolvimento de algumas doenças, como por exemplo esclerose lateral amiotrófica (ALS), autismo, demência Frontotemporal (DFT), Doença de Alzheimer, e diversos tipos de câncer (Geuens, Bouhy and Timmerman 2016; Scotti and Swanson 2016; Yoshida et al. 2011).

Existem diversos padrões alternativos de *splicing*. Um dos mais frequentes é conhecido como “*exon skipping*”. Caracteriza-se pela “não inclusão” de um *exon* na isoforma madura do mRNA em questão. A Distrofia muscular de Becker é causada por *splicing* alternativo no gene DMD: neste caso ocorre *exon skipping* do *exon 74*, o qual não é incluído no mRNA maduro (Keegan, Wilton and Fletcher 2019). A “retenção de *intron*” (*intron retention*) é um padrão de *splicing* alternativo que, como o próprio nome diz, caracteriza-se pela retenção parcial ou total de um *intron*. Esse padrão está geralmente associado com a regulação negativa de fatores de *splicing*, e é comum em células do sistema imune, como por exemplo na ativação de linfócitos T e na granulopoese (Fiszbein and Kornblihtt 2017; Wong et al. 2013). Já o “*splicing* mutuamente exclusivo” (*mutually exclusive splicing*) é o padrão no qual um ou mais *exons* são removidos durante o processo de *splicing*, e, portanto, não permanecem no mRNA maduro. Geralmente ocorre quando há *exons* com sequências muito similares, porém, a exclusão de um ou mais *exons* acarreta em isoformas diferentes com funções distintas, o que aumenta significativamente o proteoma de eucariotos (Nilsen and Graveley 2010). Um outro padrão de alternativo de *splicing* ocorre quando há reconhecimento de um sítio críptico. Este, por sua vez, caracteriza-se por ser uma sequência similar às sequências consensos, porém localizado no meio de um *intron* ou um *exon*. Quando utilizado, leva a formação de isoformas parcialmente ou integralmente disfuncionais. Alguns tipos de câncer de

mama, e síndrome de Hutchinson-Gilford, por exemplo, são desencadeados pelo uso de sítios críticos (DeBoever et al. 2015; Scaffidi and Misteli 2006).

Entre as proteínas que atuam na seleção e reconhecimento de sítios de *splicing* estão alguns componentes da família das hnRNP. Neste sentido, muitas hnRNP atuam como mediadoras do *splicing* alternativo (Martinez-Contreras et al. 2007).

1.2 Proteínas hnRNP

As hnRNPs são proteínas que possuem domínios de ligação a RNAs e compreendem uma grande família associada a transcritos produzidos pela RNA polimerase II, participando de vários aspectos do metabolismo de ácidos nucleicos (Geuens et al. 2016). Uma característica importante dessas proteínas é a presença de domínios (*motifs*) que lhes permitem interagir de maneira muito específica com os RNAs, como os domínios RRM (*RNA-recognition motif*), que devido a sua estrutura tridimensional formada por α -hélices e folhas- β , permitem que estas proteínas se associem com grande afinidade aos RNAs. Além deste, as hnRNPs contêm os domínios RGG, que são domínios auxiliares constituídos por diversos resíduos de arginina e glicina, e que podem interagir direta ou indiretamente com RNAs (Chen et al. 2013). Essas proteínas podem ser submetidas a diversas modificações pós-traducionais, como metilação, ubiquitinação e fosforilação, o que permite maior regulação de suas atividades na especificidade das ligações aos RNAs e interações com outros fatores celulares. Além disso, tais modificações podem alterar a localização celular dessas proteínas. A maioria das hnRNPs estão localizadas no núcleo, pois possuem o sinal de localização nuclear (NSL). Entretanto, após algumas modificações pós-traducionais, ou até mesmo pelo estímulo de outras hnRNPs, elas podem migrar para o citosol (Han et al. 2010).

Inicialmente essas proteínas foram relacionadas às funções de “empacotamento” dos transcritos recém-sintetizados, de modo que eram observadas associadas aos precursores de mRNAs em estruturas organizadas de maneira muito semelhante aos nucleossomos. De fato, as hnRNPs possuem papéis regulatórios importantes, seja por meio de ligações às sequências regulatórias presentes nos transcritos, seja por associação a outros fatores regulatórios (Beyer et al. 1977; Pinol-Roma et al. 1988).

Dentre outras atividades desempenhadas por hnRNPs estão a promoção de *splicing* alternativo, estabilização de RNAs mensageiros (mRNAs) e regulação de transcrição e tradução (Geuens et al. 2016). Mutações em algumas proteínas hnRNPs podem levar ao desenvolvimento de diversas patologias degenerativas, tais como esclerose lateral amiotrófica, degeneração lobar frontotemporal e atrofia muscular espinhal (Kapeli, Martinez and Yeo 2017; Moursy, Allain and Clery 2014). Além disso, os níveis de expressão das hnRNPs encontram-se alterados em diversos tipos de câncer, como por exemplo câncer de mama e neuroblastoma (Geuens et al. 2016; Huelga et al. 2012; Pino et al. 2003; Tauler et al. 2010).

As hnRNPs modulam o *splicing* alternativo de diversos pré-mRNAs, e são conhecidas como “reguladores negativos”, devido a sua capacidade de reconhecerem principalmente os sítios silenciadores nos *exons* e *introns*. Na maioria dos casos, a associação das hnRNP “esconde” ou “bloqueia” os sítios de *splicing*, levando a diferentes configurações de *splicing* alternativo. O padrão de “*exon skipping*” é o mais frequentemente encontrado (Martinez-Contreras et al. 2007; Sharma et al. 2008). Algumas hnRNPs, entretanto, já foram associadas à inclusão de *exons* em alguns transcritos, como as hnRNP F, H1, M e U (Huelga et al. 2012). De maneira geral, as hnRNPs são cooperativas e tem alta sobreposição nos alvos em que podem se ligar, o que faz com que o resultado do *splicing* dependa de uma combinação das proteínas presentes (Huelga et al. 2012).

1.2.1 hnRNP G

A proteína hnRNP G, também conhecida como RBMX (*RNA binding motif gene, X chromosome*), é transcrita a partir do gene RBMX, localizado no cromossomo X, e possui um parálogo (RBMX) no cromossomo Y (Elliott 2004; Kanhoush et al. 2010). Esta sequência codificadora, de 1176 pb, resulta em proteína de massa molecular de aproximadamente 42 kDa e 391 aminoácidos (www.uniprot.org).

Essa proteína está envolvida na regulação da expressão gênica por meio da promoção de *splicing* alternativo, através do reconhecimento das sequências AAUG e CC(A/C) no pré-mRNA (Dreyfuss et al. 1993; Heinrich et al. 2009; Hirschfeld et al. 2015). A hnRNP G controla a seleção de sítios de *splicing* em células somáticas (Soulard et al. 1993), e inibe o *splicing* do *exon* 10 do gene MAPT, cuja

desregulação dos níveis de expressão está associada ao desenvolvimento de demência frontotemporal (Wang et al. 2011). Por outro lado, elevados níveis de hnRNP G estão associados a melhores prognósticos de pacientes com câncer endometrial, por meio da regulação de *splicing* alternativo do *exon 7* dos receptores de estrógeno alfa ER- α (Hirschfeld et al. 2015).

A proteína hnRNP G também regula de forma negativa o *splicing* de mRNAs do HPV 16 (*Human papiloma virus*), inibindo a inclusão de alguns *exons* aos mRNAs maduros (Yu et al. 2018). Estudos mostraram que o HPV 16 aumenta a expressão do gene DNMT1, que por sua vez diminui a expressão de *miR-375*, que tem papel importante na regulação da proliferação de alguns tipos celulares. Desse modo, a presença desse vírus está associada ao desenvolvimento de processos carcinogênicos (Jayamohan et al. 2019; Liu et al. 2016; Yu et al. 2018).

1.2.2 hnRNP A1

A proteína hnRNPA1 é a mais estudada da família das hnRNPs, e também faz parte da subfamília hnRNP A / B, que compreende um dos grupos mais abundantes de proteínas nucleares nas células em proliferação (Barraud and Allain 2013). A sequência codificadora, de 963 pb, é transcrita a partir do gene HNRNPA1 localizado na região 12q13.1 do cromossomo 12. A proteína possui 372 aminoácidos, e massa molecular de aproximadamente 38 kDa. A hnRNP A1 possui 2 domínios RRM próximos ao N-terminal, que são divididos nos “*submotifs*” RNP-1 e RNP-2. Estes domínios são essenciais para promover a interação desta proteína com RNAs. Além disso, possui uma cauda flexível rica em glicina próximo ao C-terminal, na qual encontra-se uma sequência denominada M9, responsável por sua importação e exportação nuclear (He and Smith 2009). A hnRNP A1 associa-se ao DNA telomérico através de seus domínios RRM 1 e RRM 2, estimulando a atividade da enzima telomerase, e conseqüentemente auxiliando no alongamento das regiões teloméricas, atividade importante nas transformações celulares malignas (Roy et al. 2017).

Estudos baseados em análises proteômicas comprovaram que a hnRNP A1 participa de todas as etapas do processo de montagem do complexo do spliceossomo, além de auxiliar na distinção de sítios de *splicing* crípticos e funcionais (Tavanez et al. 2012; Zhou et al. 2002). Além disso, a hnRNP A1 é uma

importante mediadora de *splicing* alternativo. A exemplo disso, a hnRNP A1 regula o *splicing* alternativo de genes chaves como CD44 e c-MYC. CD44 codifica um receptor de membrana celular que está frequentemente superexpresso em diversos tipos de câncer, promovendo taxas aumentadas de migração e invasão celular. O gene c-MYC é um oncogene e codifica uma proteína conhecida por ser uma grande reguladora de processos tumorigênicos, e por estar envolvida no controle da proliferação e metabolismo celular. Deste modo, a proteína hnRNP A1 é potencialmente um componente de grande relevância em diversas etapas da progressão do tumor (Lee et al. 2018; Loh et al. 2015; Miller et al. 2012; Senbanjo and Chellaiah 2017). Diversos estudos apontaram que a própria hnRNP A1 está superexpressa em muitos tipos de tumores sólidos e hematológicos, como o linfoma de Burkitt, leucemia, mieloma múltiplo, câncer de próstata e câncer de pulmão (Brockstedt et al. 1998; Carabet et al. 2019; Shi et al. 2011).

De forma interessante, a hnRNP A1 parece ser também um elemento significativo para a maturação de alguns miRNAs. A exemplo disso, estudos prévios mostraram que esta proteína está associada ao *miR-18a*, associando-se ao *loop* terminal do pri-miR-18a (figura 2), promovendo a desestabilização da estrutura secundária do miRNA e facilitando, assim, a clivagem pela Drosha (Guil and Caceres 2007; Kooshapur et al. 2018).

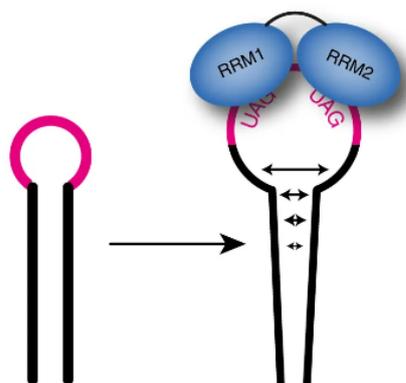


Figura 2. Representação esquemática da associação entre hnRNP A1 e pri-miR-18a. Do lado esquerdo da figura há a representação da estrutura do pri-miR18a, destacando-se em cor-de-rosa a região do *loop* terminal. À direita estão representados os domínios RRM1 e RMM2 da hnRNP A1 associados ao *loop* terminal do pri-miR-18a, promovendo um “relaxamento” (indicado pelas setas horizontais) dessa estrutura, facilitando assim a atividade catalítica realizada pela Drosha (Adaptado de Kooshapur et al. 2018).

1.3 miRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA de 18-25 nucleotídeos, não-codificadoras, que possuem funções reguladoras de expressão gênica (Jones et al. 2012), desde o remodelamento da cromatina até o controle da tradução de mRNAs específicos (Bartel 2004). Os miRNAs também estão envolvidos em inúmeros processos biológicos, tais como embriogênese e desenvolvimento, além de participarem de processos relacionados ao controle do ciclo celular, como a regulação da proliferação celular, diferenciação celular e apoptose. Tais processos são de extrema importância no surgimento e progressão do câncer, e por esse motivo, muitos estudos já demonstraram que os miRNAs estão associados ao processo de tumorigênese (Cai et al. 2015).

Aproximadamente 70% dos miRNAs humanos são transcritos a partir de *introns*, de maneira que os mecanismos envolvidos com a regulação do *splicing* são importantes para compreender a maturação dos miRNAs (Franca, Vibranovski and Galante 2016). O processo de biogênese dos miRNAs (figura 3) é iniciado através de transcrição mediada pela RNA polimerase II, gerando um miRNA primário (pri-miRNA). Em seguida, o pri-miRNA é processado por um complexo que inclui a endonuclease Drosha e DGCR8 denominado microprocessor, dando origem ao miRNA precursor (pré-miRNA), ainda no núcleo (Nguyen et al. 2013). Após isso, o pré-miRNA é transportado para o citoplasma com o auxílio da molécula Ran-GTP e da proteína Exportina-5. Já no citoplasma, um complexo proteico do qual a Dicer faz parte, atua neste pré-miRNA gerando o miRNA maduro, um RNA dupla fita (duplex) de aproximadamente 20 nucleotídeos associado ao complexo RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) (Lin, Miller and Ying 2006).

O mecanismo de ação dos miRNAs está diretamente relacionado ao grau de complementaridade no pareamento com a sequência alvo nos mRNAs. Isto é, pareamentos com altos níveis de complementariedade entre miRNAs e a sequência alvo, culminam na degradação do RNA. Por outro lado, pareamentos com baixos níveis de complementariedade, ou pareamentos “imperfeitos”, levam ao bloqueio da tradução, impedindo a passagem do ribossomo (Mohr and Mott 2015). A ação dos miRNAs pode variar dependendo do seu gene alvo. A atividade do miRNA depende muito do tipo de mRNA que ele terá como alvo. Em caso do alvo ser um supressor tumoral, a expressão do miRNA poderá levar ao fenótipo de maior proliferação

celular. Do mesmo modo, se o alvo for um oncogene, a presença do miRNA pode reduzir o crescimento celular (Esquela-Kerscher and Slack 2006; Treiber, Treiber and Meister 2019). Diversas alterações na expressão de miRNAs foram reportadas em câncer de pulmão, pâncreas, estômago, ovário e leucemias (Lu et al. 2005; Volinia et al. 2006).

Embora representem apenas 1% do genoma de mamíferos, grande parte dos miRNAs estão localizados em regiões associadas à amplificação e translocação em cânceres (He et al. 2005). Os miRNAs também podem ser encontrados em regiões pouco estáveis no genoma. A exemplo temos os miRNAs 15 e 16-1, que estão em uma determinada região do cromossomo 13 frequentemente deletada em pacientes com alguns tipos de câncer hematológicos (Calin et al. 2002; Esquela-Kerscher and Slack 2006).

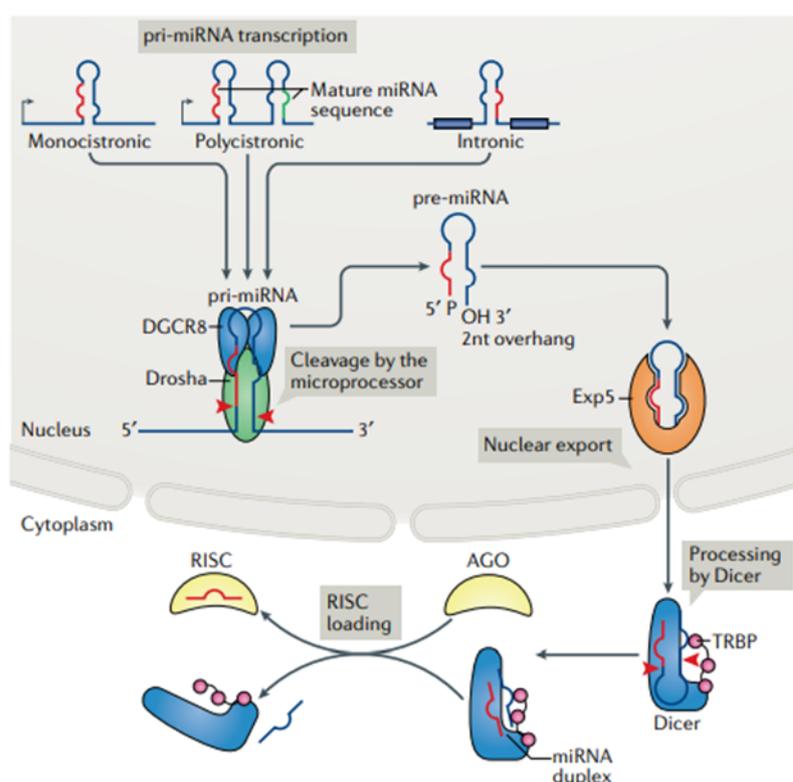


Figura 3. Processamento de miRNAs. Representação esquemática da biogênese de miRNAs através da via canônica. Os miRNAs são transcritos a partir de diferentes origens, como por exemplo a partir de genes próprios, que podem ser monocistronicos ou policistronicos, e de *introns*. Os pri-miRNAs são primeiramente processados pelo microprocessador, formando os pré-miRNAs, que são exportados para o citoplasma através da Exportina 5. No citoplasma os pré-miRNAs são processados pela Dicer, formando os duplex de miRNAs. Estes então são direcionados ao complexo RISC, finalizando o processamento, e então os miRNAs maduros podem se associar aos seus mRNAs alvos (Adaptado de Treiber et al. 2019).

1.4 MiR-17-92

Os miRNAs podem ser transcritos de forma única ou então em *clusters*, gerando transcritos de pri-miRNA policistrônicos. O *cluster* de miRNAs *miR-17-92* é transcrito a partir de um *intron* do gene MIR17HG (cromossomo 13), e é composto pelos miRNAs *miR-17-5p*, *miR-17-3p*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-20a*, *miR19b* e *miR-92-1* (figura 4) (He et al. 2005; Venturini et al. 2007).

O *cluster miR-17-92* é um componente-chave de diversas patologias, por meio da regulação de um gene alvo comum através da ativação da via PI3K/AKT. Essa via está relacionada com a proliferação celular, por meio da fosforilação de AKT por PI3K ativado. O inibidor fisiológico dessa via é o PTEN, que desfosforila PI3K, impedindo a ativação de AKT, e, portanto, limitando a proliferação celular (Bian et al. 2013; Hemmings and Restuccia 2012). O *cluster miR-17-92* atua regulando de maneira negativa a transcrição do PTEN, permitindo que as células proliferem de forma exacerbada, o que pode acarretar em processos tumorigênicos (Bai et al. 2019).

A expressão aberrante desses miRNAs está relacionada a diversos tipos de doenças, tais como Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Leucemia Mieloide Crônica (LMC), câncer de pulmão, linfomas e fibrose cística (He et al. 2005). O gene c-MYC é um potente regulador e estimula a transcrição desse *cluster*, e o fator de transcrição E2F1 é um dos alvos desses miRNAs (Concepcion, Bonetti and Ventura 2012; Mihailovich and Bonaldi 2016).

Uma característica particular deste *cluster* é que os seus componentes são processados de forma independente, e, de fato, concentrações diferentes de cada miRNA podem ser observadas em algumas patologias. Por exemplo, determinados miRNAs deste *cluster* podem ser encontrados superexpressos em alguns tipos de câncer, enquanto os outros componentes estão expressos em níveis basais. O *miR-19a* é considerado um dos principais componentes oncogênicos do *cluster miR-17-92*, e está relacionado ao desenvolvimento de linfomas (Olive et al. 2009). *MiR-92a*, por outro lado, é o principal componente desse cluster associado ao desenvolvimento de câncer colorretal (Tsuchida et al. 2011).

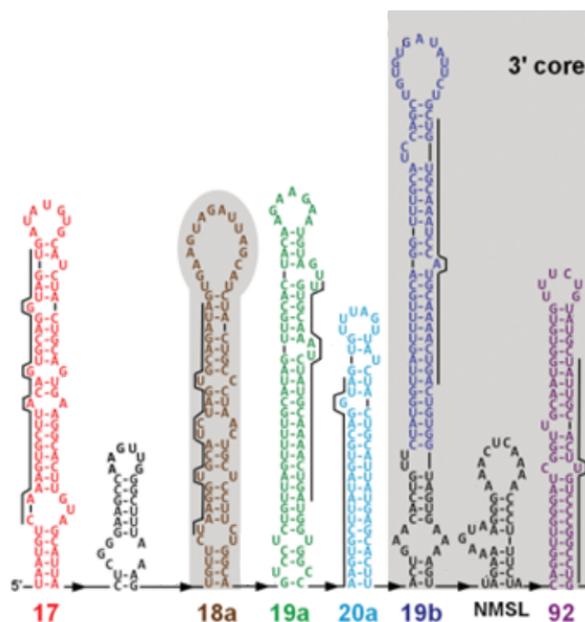


Figura 4. Representação esquemática da estrutura secundária do pri-miR-17-92. As seqüências dos pré-miRNAs estão em diferentes cores, seguindo a seqüência pela qual são transcritas. As linhas verticais paralelas (preto) correspondem às seqüências dos miRNAs maduros. NMSL (*non-miRNA containing stem-loop*) é uma estrutura que não resulta em um miRNA (Adaptado de Chaulk et al. 2011).

Considerando-se que o *cluster miR-17-92* é intrônico, é possível que a regulação de sua expressão esteja relacionada à atividade do spliceossomo. Recentemente, dados obtidos em nosso laboratório revelaram a presença de proteínas da família das hnRNPs em complexos spliceossomo isolados a partir de células tumorais de tireoide (Paiva, Kimura and Coltri 2017). Proteínas como hnRNP G, L, R, U e A1 foram observadas apenas em spliceossomos isolados formados a partir de *introns* com miRNAs do *cluster*. Desta forma, nossa hipótese para esse trabalho foi de que é possível que as proteínas hnRNPs estejam associadas a *introns* contendo miRNAs, e que possam mediar seu *splicing* em células tumorais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a associação das proteínas hnRNP A1 e hnRNP G (RBM-X) aos miRNAs do *cluster miR-17-92*.

2.2 Objetivos específicos

- i. Superexpressar as proteínas hnRNPA1 e hnRNP G em células BCPAP e HEK 293T.
- ii. Verificar a associação de hnRNP A1 e hnRNP G aos miRNAs do *cluster miR-17-92*, comparando com células que expressam somente o epítipo FLAG.
- iii. Avaliar parâmetros de proliferação, migração e invasão celulares em células com expressão aumentada de hnRNP A1 e hnRNP G.

3 METODOLOGIA

3.1 Clonagem e obtenção de vetores de superexpressão

Com o intuito de superexpressar a proteína hnRNP A1, antes do início do presente trabalho foi construído o plasmídeo FLAG-hnRNP A1, utilizando-se a mesma metodologia que será descrita abaixo.

Utilizando-se pares de primers desenhados especificamente para hnRNP G (tabela 1), foram obtidos através da técnica de PCR os produtos com tamanhos esperados (1200 pb), que foram clonados no vetor pGEM T-easy (PROMEGA). O pGEM T-easy é um vetor de alta cópia, indicado para clonagens de produtos de PCR. Além disso, é possível efetuar seleção utilizando-se o gene da β -galactosidase, que confere coloração azul às colônias de *E. coli* DH5 α na presença de X-gal, caso o plasmídeo não tenha recebido inserto. Para confirmação da integridade das sequências, os vetores foram sequenciados utilizando-se os primers direto e reverso para M13 (pGEM T-easy), e os resultados foram analisados em comparação com banco de dados NCBI. Em seguida, a sequência de hnRNP G foi subclonada em vetor pFLAG-CMV3 (Sigma) entre os sítios de restrição para EcoRI e BamHI gerando o plasmídeo FLAG-hnRNP G. O vetor pFLAG é utilizado para transfecções estáveis ou transientes em células de mamíferos, e possui gene de resistência a Geneticina (G418), o que permite selecionar as células que receberam o vetor a partir do uso deste antibiótico. Estes plasmídeos foram utilizados posteriormente para transfecção em células BCPAP e HEK-293T.

Tabela 1- Primers utilizados neste trabalho.

Primer	Sequência 5'-3'	Alvo
PC9	ATAGCCTCGAGGTCAGAATAATG	direto pré-miR17 (qPCR)
PC10	ATGATAAGCTTGTACCATAATG	reverso pré-miR17 (qPCR)
PC11	ATAGCCTCGAGTGTCTAAGG	direto pré-miR18 (qPCR)
PC12	ATGATAAGCTTTGCCAGAAGG	reverso pré-miR18 (qPCR)
PC13	ATAGCCTCGAGGCAGTCCTCTGTTAG	direto pré-miR19 (qPCR)
PC14	ATGATAAGCTTGCAGGCCACCATCAG	reverso pré-miR19 (qPCR)
PC15	ATAGCCTCGAGCTTTCTACAC	direto pré-miR92 (qPCR)
PC16	ATGATAAGCTTCCAAACTCAAC	reverso pré-miR92 (qPCR)
PC32	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	direto M13 (Sequenciamento)
PC33	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	reverso M13 (Sequenciamento)
PC160	CTGTATCACGTGGAAGAGATAG	direto hnRNP G (qPCR)

PC161	GGGACAAATAAACATCTCTACG	reverso hnRNP G (qPCR)
PC162	TGCAAAACCACGAAACCAAG	direto hnRNP A1 (qPCR)
PC163	GCTTCCCTGTCACTTCTCTG	reverso hnRNP A1 (qPCR)
PC168	ACCTTCTACAATGAGCTGCG	direto B-Actina (qPCR)
PC169	CCTGGATAGCAACGTACATGG	reverso B-Actina (qPCR)
PC170	CTCGCTTCGGCAGCACATATAC	direto snRNP U6 (qPCR)
PC171	GGAACGCTTCACGAATTTGCGTG	reverso snRNP U6 (qPCR)
PC212	GCCGCGAATTCAATGTCTAAGTCAGAGTCTCCT	direto hnRNP A1 (Clonagem)
PC213	GCGGGATCCAAAATCTTCTGCCACTGCC	reverso hnRNP A1 (Clonagem)
PC268	ATTGCGAATATGGTTGAAGCAGATCGCCC	direto hnRNP G (Clonagem)
PC269	ATTGGATCCCTAGTATCTGCTTCTGCCTC	reverso hnRNP G (Clonagem)
PC313	CGGTCGTAGTAAAGCGCAGG	direto MIR17HG 1 (qPCR)
PC314	CTGGTGCAGTTAGGTCCACG	reverso MIR17HG 1 (qPCR)
PC315	GGTACACATGGACTAAATTGCCT	direto MIR17HG 2 (qPCR)
PC316	GGAAGTGGTGGCTCTTCCAA	reverso MIR17HG 2 (qPCR)

3.2 Cultura de células e transfecção

Neste trabalho foram utilizadas células BCPAP e HEK 293T. HEK 293T é uma linhagem celular derivada de rim embrionário humano, e possui o antígeno T SV40. Trata-se de uma linhagem imortalizada que pode ser transfectada com altas taxas de eficiência (Lin et al. 2014).

As células BCPAP derivam do carcinoma papilífero de tireoide, e sua característica é a presença de uma mutação no oncogene BRAF, gerando a proteína BRAF^{T1799A} (Kimura et al. 2003). Essa linhagem celular foi cedida pela Profa. Dra. Edna Teruko Kimura (Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB-USP).

As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM (Thermo) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U / mL de penicilina, 1ug / mL de estreptomicina e 2,5 ug /mL de anfotericina B, a 37°C e 5% CO₂. As células foram mantidas em placas de 100 mm, e o meio de cultura foi substituído a cada dois dias. Os plasmídeos pFLAG-hnRNP A1, pFLAG-hnRNP G, e pFLAG (vazio) foram transfectados em células HEK 293T e BCPAP utilizando-se Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram selecionadas aumentando gradualmente a concentração de geneticina (G418) até atingir concentração de 1000 ng/mL. Todas as células foram tripsinizadas sempre que atingiam uma confluência de aproximadamente 80%.

3.3 Curvas de crescimento

Células BCPAP-hnRNP A1, BCPAP-FLAG e BCPAP sem transfecção foram semeadas ($2,5 \times 10^4$ /ml) em placas de 12 poços (Corning Inc) e cultivadas durante 24h. Depois do plaqueamento (tempo 0h), e após 24h, 48h e 72h de crescimento, as células foram tripsinizadas, coletadas, coradas com solução Trypan Blue (Sigma Aldrich) a 0,4%, em uma proporção de 1:1, e contadas utilizando Countess II FL (Life Technologies Carlsbad, CA). Cada ensaio foi realizado em triplicata e realizado 3 vezes para cada amostra biológica.

3.4 Ensaio de migração e invasão

Inicialmente, a migração celular foi avaliada utilizando-se ensaio da ferida *in vitro*. Células transfectadas e do grupo controle foram semeadas em placas de 100 mm para criar uma monocamada confluenta. As células foram incubadas durante aproximadamente 24 horas a 37°C, permitindo sua adesão e espalhamento pela placa. Utilizando-se uma ponteira p10, foi realizado um risco vertical na monocamada de células, com o intuito de criar uma "ferida". Em seguida, o meio contendo as células que foram removidas durante esse procedimento foi recolhido, e 10 mL de DMEM foi adicionado às placas. As imagens de contraste de fase foram gravadas nos tempos 0, 24 e 48 horas após o risco. Com base em imagens adquiridas com microscopia de luz, as medidas do tamanho da ferida provocada pelo risco foram realizadas usando o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA). O experimento foi repetido três vezes para excluir qualquer variação possível causada pela diferença na largura dos riscos.

Os ensaios de migração e invasão foram realizados usando câmaras transwell com membranas com poros de 8.0 μ m (Corning Inc). Estes ensaios permitiram verificar os efeitos da superexpressão da hnRNP A1 na capacidade migratória e invasiva de células. Para os ensaios de migração, as membranas foram revestidas com PBS (Na_2HPO_4 3,2 mM, KH_2PO_4 0,5 mM, KCl 1,3 mM, NaCl 135 mM, pH 7,4) e incubadas durante 1 h a 37°C, 5% de CO_2 . Para os ensaios de invasão, as membranas foram revestidas com 25 μ g de Matrigel® (BD Biosciences) e incubadas por 1 h a 37 °C, 5% de CO_2 . Cerca de $2,5 \times 10^4$ / ml de células foram suspensas em meio de cultura contendo 1% de SFB e plaqueadas na câmara superior, enquanto a câmara inferior continha meio de cultura com 10% de SFB.

Após 6h de incubação a 37°C, 5% de CO₂, as células que não migraram da câmara superior foram removidas utilizando hastes flexíveis, e as células que migraram através da membrana foram fixadas (utilizando-se 4% paraformaldeído - PFA em PBS) e coradas com 0,5% de cristal violeta. As células foram fotografadas utilizando um microscópio Nikon Eclipse E600 equipado com epi-fluorescência da câmara óptica CF160 e foram contados 10 campos representativos.

3.5 Viabilidade celular

Paralelamente aos ensaios de migração e invasão celular, e com o objetivo de garantir que as células estavam viáveis, foram realizados ensaios de exclusão por *Trypan Blue* (Sigma Aldrich), que permitem verificar a integridade da membrana celular. Células mortas não possuem seletividade da membrana, permitindo assim a incorporação do corante *Trypan blue* (Strober 2015).

Cerca de $2,5 \times 10^4$ de células foram suspensas em meio de cultura contendo 10% de SFB e plaqueadas em placas de 12 poços (Corning Inc). Após incubação de 6 h a 37°C, 5% de CO₂, as células foram coletadas e coradas com solução Trypan Blue a 0,4%, em uma proporção de 1:1, e os números de células viáveis e não viáveis foram obtidos utilizando Countess II FL (Life Technologies Carlsbad, CA).

3.6 Análise do ciclo celular com iodeto de propídio

Aproximadamente 1×10^5 células foram semeadas em placas de 6 poços (Corning Inc) e incubadas nas condições descritas acima durante 48 horas. Após esse período, as células foram tripsinizadas, coletadas em tubos de 15 mL e lavadas duas vezes com PBS. O PBS foi retirado e as células foram fixadas adicionando-se 3 mL de metanol gelado e 1 mL de PBS, por 16 h a 4°C. Depois desse período as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 8 minutos, e então a solução fixadora foi removida. As células foram lavadas 1 vez com PBS e incubadas com solução de coloração (200 ul PBS, 20 ug de RNase e 10 ug/mL de iodeto de propídio) por 1 h a 4°C. Em seguida foi realizada a leitura das amostras no citômetro GUAVA.

3.7 Imunoprecipitação

Células BCPAP e HEK superexpressando hnRNP A1, bem como células controle que expressam apenas o epítipo FLAG, foram cultivadas durante 48 h em placas de 100 mm. Depois de terem sido recolhidas, foram utilizadas para preparo dos extratos celulares, em tampão A (KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris 20 mM [pH 7,5], DTT 0,5 mM) contendo inibidores de protease (Sigma), e depois foram homogeneizados usando Douncer (Wheaton, NJ). A proteína A-Sepharose foi lavada (*pre-cleaning*) e bloqueada com BSA conforme instruções do fabricante. Em seguida, ela foi incubada com anti-FLAG M2 (Sigma) na proporção 1:250, por 16 horas a 4°C, sob agitação rotativa, e após 3 lavagens com PBS, a proteína A-Sepharose foi equilibrada com 2 volumes de Tampão A. Os extratos celulares foram imunoprecipitados por incubação com proteína A-Sepharose acoplada ao anti-FLAG M2 por 4 horas a 4°C, sob agitação rotativa. Após a incubação, a resina foi lavada três vezes utilizando-se tampão PBS, para remover as ligações não específicas. As proteínas foram eluídas utilizando-se 25 µg /ul de peptídeo FLAG diluído em PBS durante 16 h, a 4°C. Frações das eluições foram utilizadas para realizar a extração de RNA.

3.8 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído das células superexpressando as proteínas de interesse e das células controle a partir de preparação de extrato utilizando-se tampão A gelado e o Douncer (Wheaton, NJ) (conforme descrito no item 3.7). A partir dessa etapa, foram adicionados, tanto aos lisados de células quanto às amostras de eluição das imunoprecipitações, o reagente Trizol (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) para realização da extração de RNA total, conforme as instruções do fabricante. Após precipitação do RNA com 3 M de acetato de sódio pH 5.2 e etanol, as amostras foram ressuspensas em água milliQ. Após confirmação da integridade das amostras de RNA, estas foram submetidas à síntese de cDNA, utilizando-se a enzima Superscript IV RT (Life Technologies, Carlsbad, CA) e primers randômicos, conforme as instruções do fabricante. Esses cDNAs foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop e utilizados para ensaios de PCR convencional e quantitativo.

3.9 PCR quantitativo em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi realizado com 100 ng de cDNAs, reagente SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e 3.2 pmol *primers* específicos para o mRNA de hnRNP A1, β -actina, *miR-17a*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-92a* e RNU6 (tabela 1). Variações na expressão gênica (*fold changes*) foram normalizadas por amplificação com primers para β -actina ou RNU6.

3.10 Silenciamento de hnRNP A1

Para obter células com expressão reduzida da hnRNP A1 foi utilizado siRNA validado para hnRNP A1 (número de catálogo AM16708, Life Technologies). Como controle, os mesmos experimentos foram realizados com o siRNA controle negativo (número de catálogo 4390843, Life Technologies). Células BCPAP foram semeadas em placas de 6 poços (Corning Inc) e incubadas durante 24h. Em seguida, concentrações de 2,5 nM, 5 nM e 10 nM do siRNA-hnRNP A1 foram transfectadas utilizando-se Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA), conforme instruções do fabricante. Foram utilizadas como controle células transfectadas com siRNA controle e também células não transfectadas. Após 30 h de transfecção, as células foram coletadas para realização de extração de RNA e síntese de cDNA, e as amostras foram analisadas através de RT qPCR utilizando-se primers específicos (tabela 1) para quantificação do mRNA de hnRNP A1.

3.11 Regulação do *splicing* de MIR17HG

Para avaliarmos se a hnRNP A1 regula o *splicing* do gene MIR17HG, realizamos primeiramente um RT-PCR convencional, e posteriormente um RT-qPCR, utilizando-se 100 ng de cDNA de células BCPAP sem transfecção (controle), BCPAP-hnRNP A1 (superexpressão hnRNP A1) e BCPAP-siRNA A1 (silenciada), e dois pares de *primers*: PC313 e PC314 (transcrito 201); PC315 e PC316 (transcrito 203) (tabela 1, figura 5). O primeiro par de *primers* é constituído do *primer* direto (PC313) que anela próximo a região 5' do *exon 2*, e pelo *primer* reverso (PC314), que anela no *exon 2* após o sítio de *splicing* alternativo, dessa forma detectando apenas o transcrito 201 do gene MIR17HG. O segundo par de *primers* é constituído do *primer* direto (PC315) e pelo *primer* reverso (PC316), que se anelam no *intron 3*

antes da região onde se encontra o *cluster miR-17-92*, dessa forma detectando o transcrito 203, isoforma proveniente do *splicing* alternativo e que contém a região do *intron* com o *miR 17-92*.

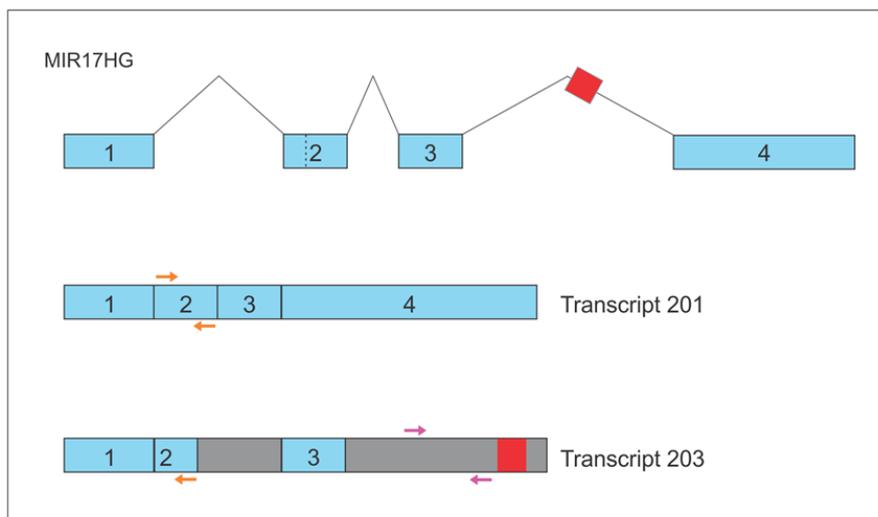


Figura 5. Representação esquemática do pré-RNA do gene MIR17HG. Na parte superior está representado o transcrito do gene MIR17HG. As caixas azuis representam os *exons*, as linhas cinzas representam os *introns*, a caixa vermelha representa o pri-miR-17-92, e a linha vertical tracejada no *exon 2* representa a região que é removida na isoforma do transcrito 203. As setas laranjas indicam a região de anelamento dos primers 313 (direto) e 314 (reverso) no *exon 2*. O transcrito 203 é a isoforma mais comum, e resulta de *splicing* alternativo, com a retenção do *intron 2* e de parte do *intron 3* (caixas cinzas), além de remoção parcial da região 5' do *exon 2*. As setas roxas indicam a região de anelamento dos primers 315 (direto) e 316 (reverso) no *intron 3*.

3.12 Análises estatísticas

Os resultados são expressos como média \pm SEM. Todos os dados experimentais foram coletados em pelo menos 3 experimentos independentes para excluir qualquer variação possível causada por proliferação, migração e invasão celular. Os resultados dos experimentos de imunoprecipitação foram analisados por *one-way ANOVA* seguidos pelo pós-teste Tukey, para, para permitir a comparação entre os grupos analisados.

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação da superexpressão de hnRNP A1 e varredura dos miRNAs

O plasmídeo pFLAG-hnRNP A1 foi transfectado em células HEK 293T e BCPAP, e estas células foram selecionadas com Geneticina (G418). O vetor pFLAG vazio foi transfectado em ambas linhagens, para que elas fossem utilizadas como controles experimentais. A superexpressão foi confirmada através de RT-qPCR (figura 6), utilizando-se *primers* específicos para a detecção de hnRNP A1. Através de RT qPCR também foi realizado um rastreamento dos miRNAs do *cluster miR-17-92* em células HEK 293T e BCPAP (figura 7), para que fosse possível comparar os níveis de expressão destes entre células superexpressando a proteína de interesse e as células controle. Para esse experimento, foram utilizados *primers* para as sequências de *miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a* e *miR-92a*. Os resultados mostraram que, em BCPAP, a superexpressão de hnRNP A1 está associada a um aumento significativo de *miR-19a* e *miR-92a*, em comparação com células expressando apenas o epítipo FLAG. Já em HEK 293T, a superexpressão de hnRNP A1 não interfere nos níveis dos miRNAs analisados, já que foram observadas concentrações similares antes e depois da superexpressão.

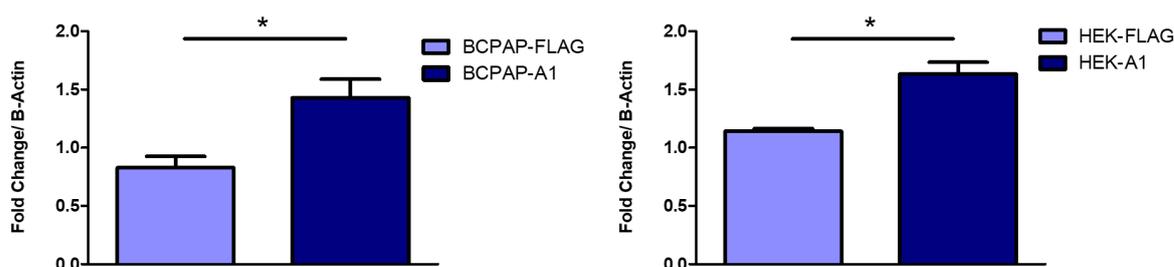


Figura 6. Confirmação da superexpressão de hnRNP A1. Células BCPAP e HEK 293T foram transfectadas com o plasmídeo pFLAG-hnRNP A1 (barra azul escura). O grupo controle expressava apenas o epítipo FLAG (barra azul clara). Para o cálculo de variação na expressão (*fold change*) foi realizada normalização com amplificação de β -actina. Barras de erro representam desvios padrão calculados a partir de três experimentos independentes. * P <0,05.

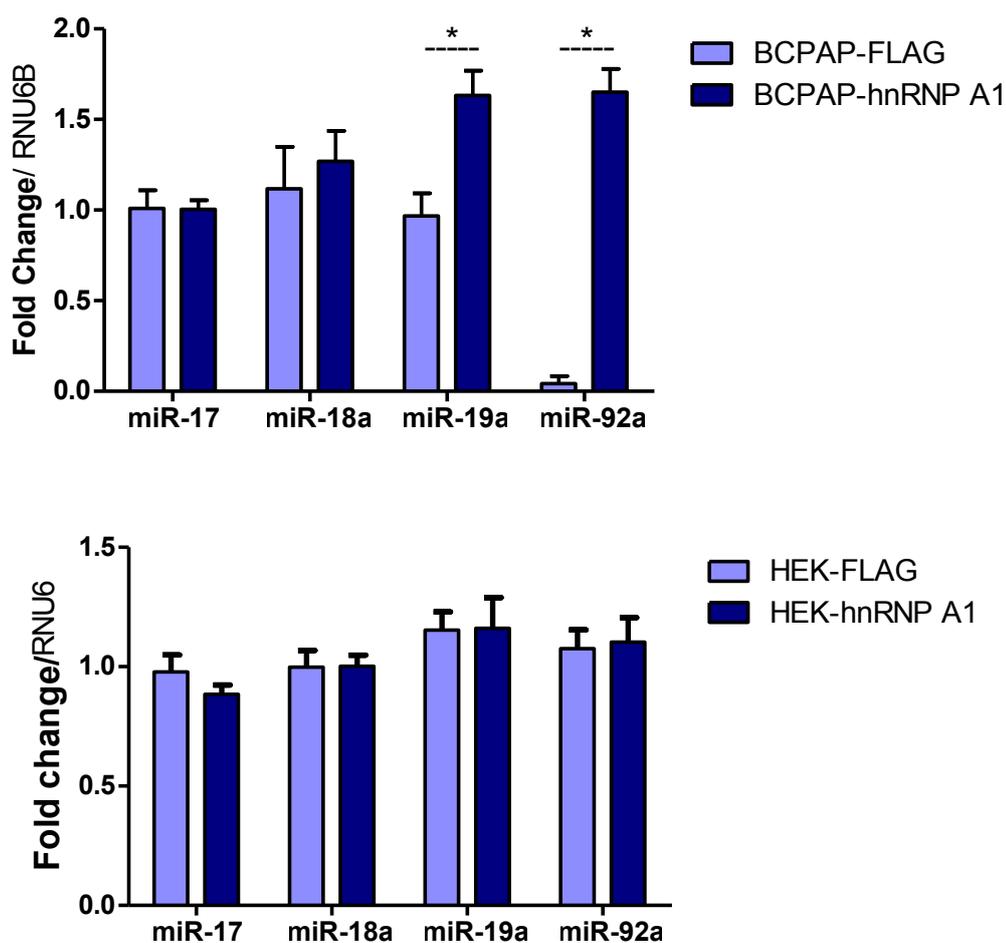


Figura 7. Análise da expressão dos miRNAs. Análise da expressão dos miRNAs *miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a* e *miR-92a* em células BCPAP (painel superior) e HEK 293T (painel inferior) superexpressando FLAG-hnRNP A1 (barra azul escura). O grupo controle expressava apenas o epítipo FLAG (barra azul clara). Para o cálculo de variação na expressão (*fold change*) foi realizada normalização com amplificação do gene de RNU6B. Barras de erro representam desvios padrão calculados a partir de três experimentos independentes. * P <0,05.

4.2 Imunoprecipitação de hnRNP A1 e associação ao cluster *miR-17-92*

Para avaliar se a proteína hnRNP A1 estava associada a algum miRNA do *cluster*, foram realizados ensaios de imunoprecipitação utilizando-se as células BCPAP-hnRNP A1, além do controle que expressa somente o epítipo FLAG (figura 8). Os resultados obtidos revelaram que, em células BCPAP, hnRNP A1 associa-se a *miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a*, mas não ao *miR-92a*. Estes resultados apoiam os estudos prévios, os quais reportaram a participação da proteína hnRNP A1 no

splicing e maturação dos miRNAs do *cluster miR-17-92*, especialmente com *miR-18a* (Guil and Caceres 2007).

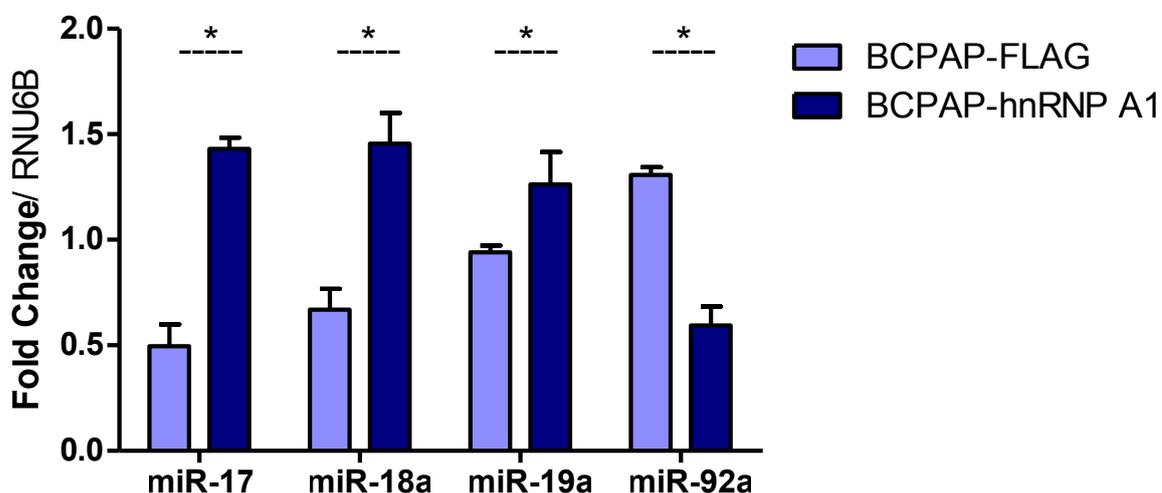


Figura 8. Análise dos níveis de miRNA associados ao FLAG-hnRNP A1. Células BCPAP transfectadas com o vetor pFLAG vazio foram usadas como controle nas imunoprecipitações (barra azul clara). As amostras foram analisadas por RT-qPCR usando primers específicos para os *miRNAs*. O valor da expressão (*fold change*) foi normalizado com a expressão de RNU6B. Barras de erro representam desvios padrão calculados a partir de três medições independentes. * P < 0,05.

4.3 Análise *in silico* da interação entre hnRNP A1 e o cluster *miR-17-92*

Com os resultados de imunoprecipitação obtidos, revelando que a hnRNP A1 está associada aos miRNAs do *cluster miR-17-92*, nós nos questionamos se essa associação poderia ocorrer de uma maneira direta, isto é, se haveria uma região nestes pri-miRNAs na qual hnRNP A1 poderia potencialmente se ligar, já que esta proteína possui 2 domínios RRM. Assim, uma análise *in silico* utilizando os bancos de dados UniProt (www.uniprot.org), NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e miRBase (www.mirbase.org) foi realizada (figura 9). Para esta análise, foi realizada uma busca pela sequência consenso de ligação a hnRNP A1 “UAGG” (Bruun et al. 2016) no pri-miRNA-17-92. Pode-se observar que existem duas regiões da sequência do pri-miRNA-17-92 que possuem potenciais sítios de ligação para hnRNP A1: no início da sequência (antes de *miR-17*), e entre os pri-miR-18a e pri-miR-19a (figura 9).



Figura 9. Análise *in silico* para verificar associação de hnRNP A1 ao pri-miR17-92. A sequência codificadora do pri-miR-17-92 está mostrada. Os pri-miRNAs do *cluster* estão marcados com diferentes cores: em verde está a sequência do pri-miR-17; em amarelo a sequência do pri-miR-18a; em azul claro está a sequência do pri-miR-19a; em lilás está a sequência do pri-miR-20a; em cinza está a sequência do pri-miR-19b; e em laranja está a sequência do pri-miR-92a. No retângulo vermelho está destacado os possível sítio de interação da hnRNP A1 com este *cluster*. Foram utilizados os bancos de dados UniProt, NCBI e miRBase como referências.

4.4 Células superexpressando hnRNP A1 possuem maior índice proliferativo

Uma importante questão sobre a ação de hnRNP A1 no *splicing* dos miRNAs está relacionada ao efeito que tal superexpressão e, conseqüentemente, maior processamento dos miRNAs, tem sobre a cinética celular. Por isso, investigamos quais eram os impactos desta superexpressão nas células BCPAP. Deste modo, avaliamos a proliferação celular, realizamos ensaios de migração e invasão, ensaios de ciclo celular, e análises de imunofluorescência para verificar a morfologia das células.

A curva de crescimento utilizando *Trypan blue* (figura 10), permitiram realizar a contagem das células viáveis e não viáveis nos tempos de 24h, 48h e 72h de incubação. Observamos que células superexpressando hnRNP A1 crescem mais do que as células controle (células expressando apenas epítipo FLAG e células não transfectadas).

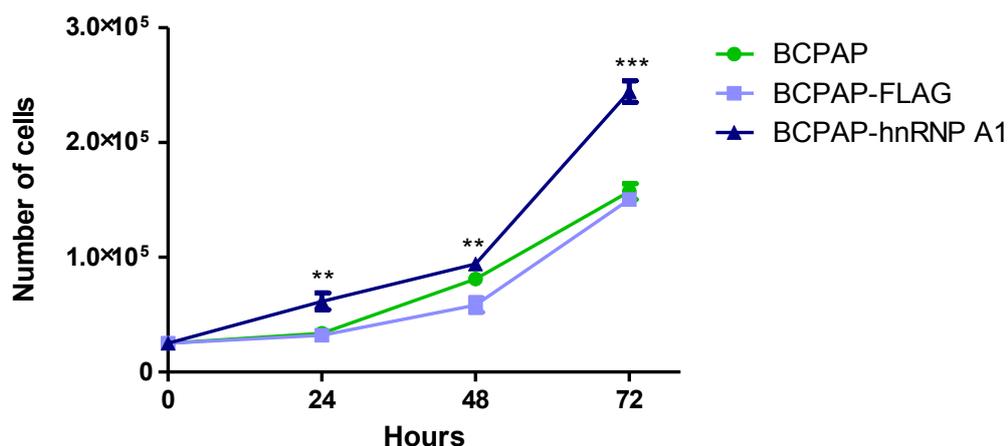


Figura 10. Curva de crescimento. Contagem de células BCPAP superexpressando hnRNP A1 foi realizada após 24h, 48h e 72h de incubação, utilizando-se o método de exclusão por *Trypan blue*. Em verde, células BCPAP (não transfectadas); em azul claro células BCPAP-FLAG e em azul escuro células BCPAP-hnRNP A1. As células viáveis foram quantificadas utilizando-se o equipamento Countess II FL Automated Cell Counters (ThermoFisher). Os valores representam as médias das triplicatas de cada grupo. ** P <0,005 e ***P <0,0005.

4.5 Células superexpressando hnRNP A1 possuem capacidades migratória e invasiva maiores

Foi realizado também o ensaio de ferida (*wound assay*) (figura 11) como experimento preliminar para observarmos se havia diferença no perfil migratório de células superexpressando hnRNP A1. O ensaio de fechamento de ferida celular permite analisar a habilidade de uma determinada linhagem celular em migrar, e subsequentemente fechar uma “ferida” feita em uma placa confluyente de células. Este ensaio foi realizado em células BCPAP e HEK 293T superexpressando hnRNP A1, e seus respectivos controles, durante um período de 24h. As imagens foram capturadas nos tempos 0h, 12h e 24h após realização da ferida. Observamos que as células superexpressando hnRNP A1 migram 40% mais do que as células controle, o que indica que a superexpressão de hnRNP A1 pode estar relacionada ao processo migratório destas linhagens.

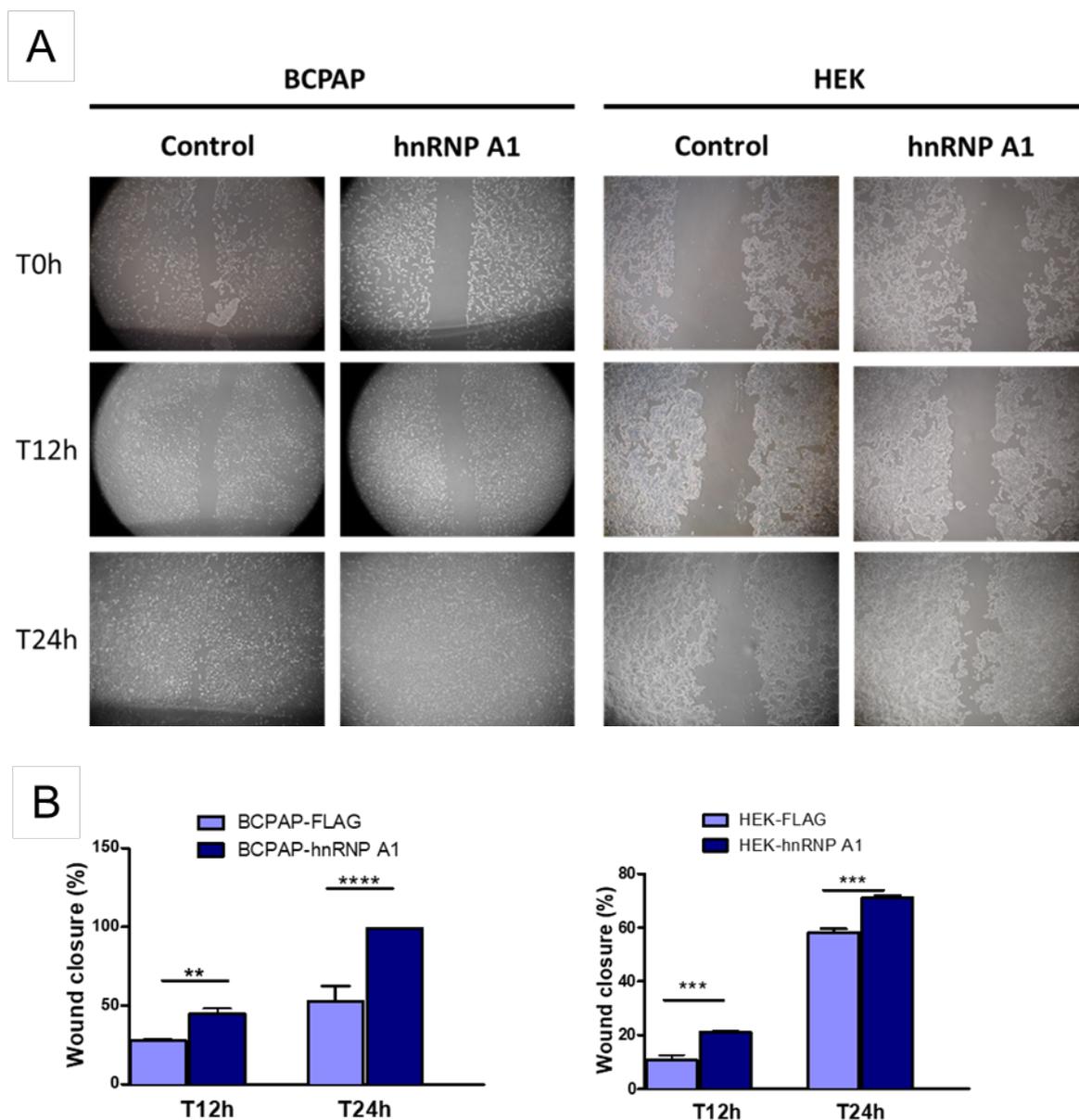


Figura 11. Ensaio de ferida utilizando-se células BCPAP-FLAG (controle), BCPAP-hnRNP A1, HEK-FLAG (controle) e HEK-hnRNP A1. Durante um ensaio de fechamento de feridas de 24 horas, as imagens foram obtidas a cada 12 horas usando microscopia de luz. (A) Imagens representativas das células BCPAP-hnRNP A1 (painel à esquerda) e HEK-hnRNP A1 (painel à direita) após 0, 12 e 24 h. O fechamento da ferida foi medido em μm . (B) A quantificação do fechamento da ferida após 12 h e 24 h está representada em gráficos: à esquerda, quantificação de BCPAP-hnRNP A1; e à direita, quantificação de HEK-hnRNP A1. A barra azul clara representa o controle (transfectado com pFLAG) e a barra azul escura representa as células superexpressando hnRNP A1. As medidas do tamanho da ferida foram realizadas usando o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA). ** $P < 0,005$, *** $P < 0,0005$ e **** $P < 0,0001$.

Com a observação de que havia possivelmente uma diferença no perfil migratório dessas células, decidimos realizar ensaios para quantificar as taxas de

migração e invasão de forma mais precisa. Além disso, o efeito observado poderia ser explicado pela divisão das células, uma vez que não foi realizado tratamento com anti-mitóticos antes da realização do ensaio da ferida. Para isso, foram realizados experimentos utilizando-se *transwell*, com o intuito de analisar a capacidade migratória e invasiva diferencial das células superexpressando a proteína hnRNP A1. Neste ensaio, conforme descrito na metodologia, as células foram semeadas em meio com menor concentração de soro fetal bovino, sobre a membrana transwell. No compartimento inferior há concentração maior de soro (10%) e espera-se que as células migrem para o compartimento inferior. No caso do ensaio de invasão, uma camada de matrigel cobre a membrana de transwell, simulando uma camada de matriz extracelular que poderia recobrir a célula e impedir ou atrasar sua migração para outros locais. O estudo da migração celular na pesquisa do câncer é de particular interesse, pois a principal causa de morte em pacientes com câncer está relacionada à progressão metastática (Castellone et al. 2011). Para que o câncer se espalhe e se dissemine por todo o corpo, as células cancerosas devem migrar e invadir a matriz extracelular (MEC), infiltrar-se na circulação sanguínea, anexar-se a um local distante e finalmente extravasar para formar focos distantes (Castellone et al. 2011; Hanahan and Weinberg 2011). Os resultados observados indicam que a superexpressão de hnRNP A1 em células BCPAP aumenta a capacidade individual migratória e invasiva dessas células, comparadas com o controle (figura 12).

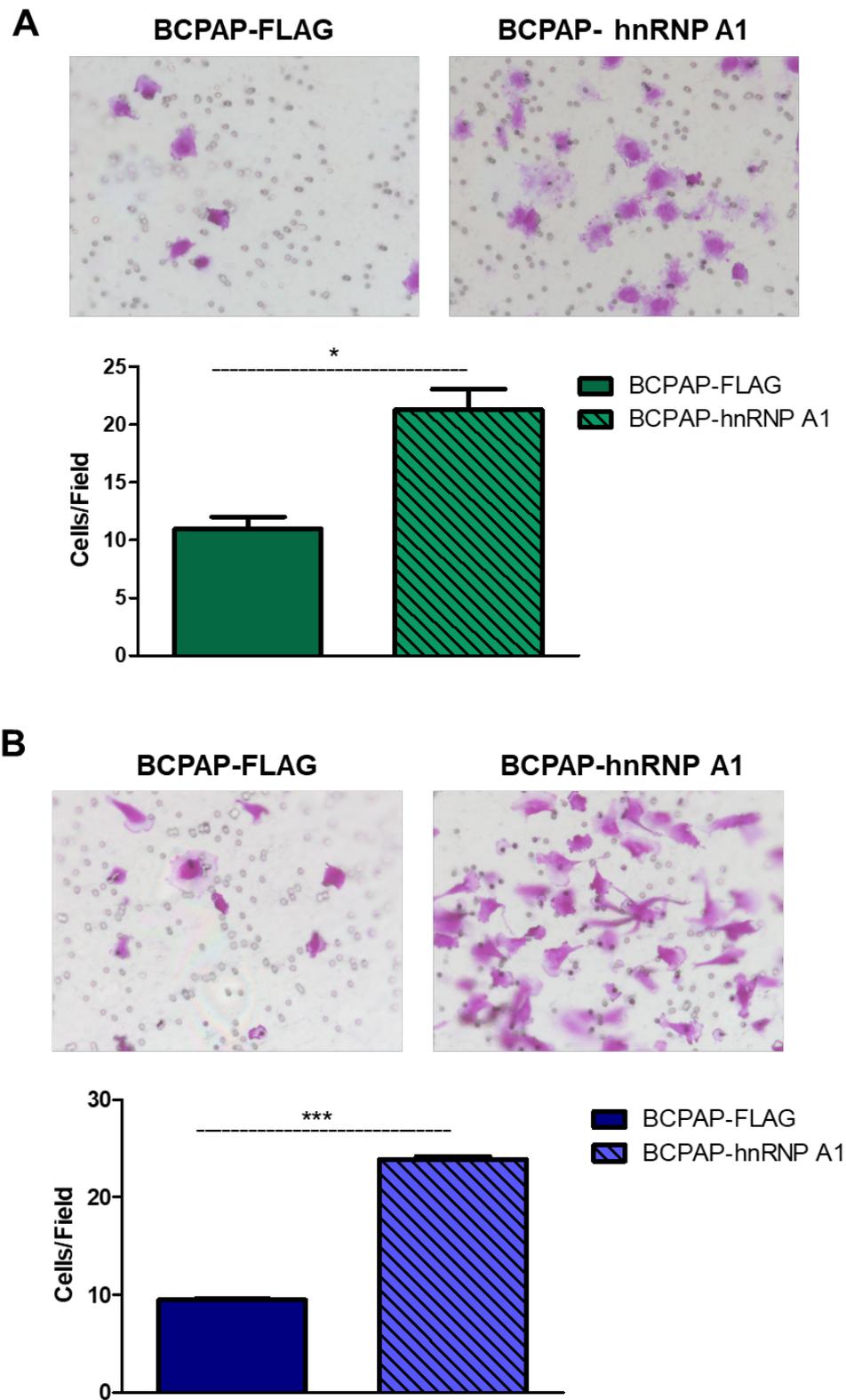


Figura 12. Ensaio de *transwell* para avaliar migração e invasão celulares em células BCPAP-FLAG (controle) e BCPAP-FLAG-hnRNP A1. Ensaio utilizando *transwell* para (A) migração e (B) invasão, foram realizados por 6h. Imagens representativas das células que atravessaram o *transwell* estão apresentadas na parte superior dos painéis, e a quantificação de aproximadamente dez campos está

mostrada na parte inferior das figuras. O eixo y indica a média do número de células por campo. Todos os experimentos foram realizados três vezes. * P <0,05 e *** P <0,0005.

Considerando-se que as células utilizadas para o ensaio de *transwell* foram inicialmente tripsinizadas, e por tratar-se de um experimento relativamente breve, decidimos verificar se as células estavam viáveis. Deste modo, junto aos ensaios de *transwell*, a mesma quantidade de células foi semeada em placas separadas e cultivadas durante 6h, e então essas células foram coletadas e quantificadas pelo método de exclusão por *Trypan blue* (figura 13). Foram observados que 90% do número total de células de todos os grupos permaneciam viáveis.

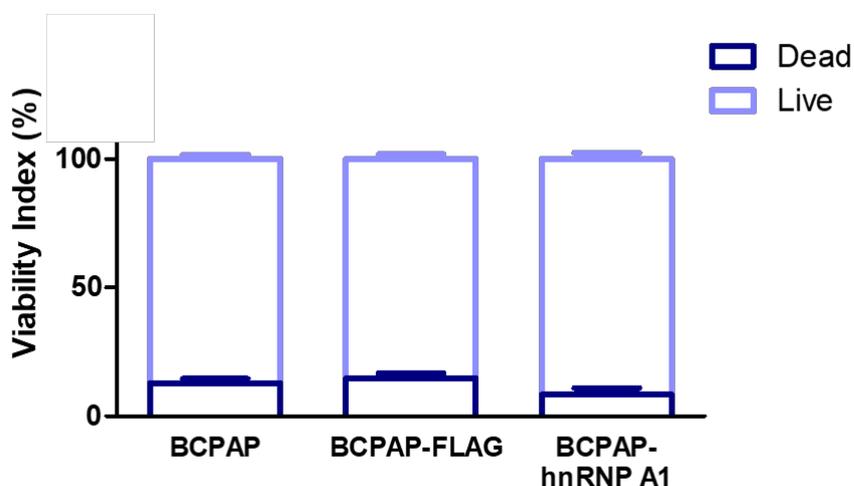


Figura 13. Ensaio de viabilidade. O índice de viabilidade das células (eixo y) após 6h de cultivo foi calculado após contagem das células usando o método de exclusão por *Trypan blue*. As porcentagens de células viáveis (azul claro) e não viáveis (azul escuro) foram quantificadas utilizando-se o equipamento Countess II FL Automated Cell Counters (ThermoFisher). Os valores percentuais são complementares, e cada barra representa um valor absoluto de 100% das células (viáveis + não viáveis).

4.6 Ensaio de ciclo celular

Com os resultados dos ensaios de migração e invasão, decidimos investigar se a superexpressão de hnRNP A1 poderia alterar o perfil do ciclo celular. O ensaio de ciclo celular foi realizado com iodeto de propídio (IP), um corante bastante utilizado devido à sua capacidade de intercalar-se com o DNA dupla fita, produzindo um sinal altamente fluorescente quando excitado a 488 nm com uma ampla emissão centrada em torno 600 nm. As análises mostraram que a superexpressão de hnRNP

A1 não alterou significativamente a progressão do ciclo celular (figura 14) em células BCPAP e HEK.

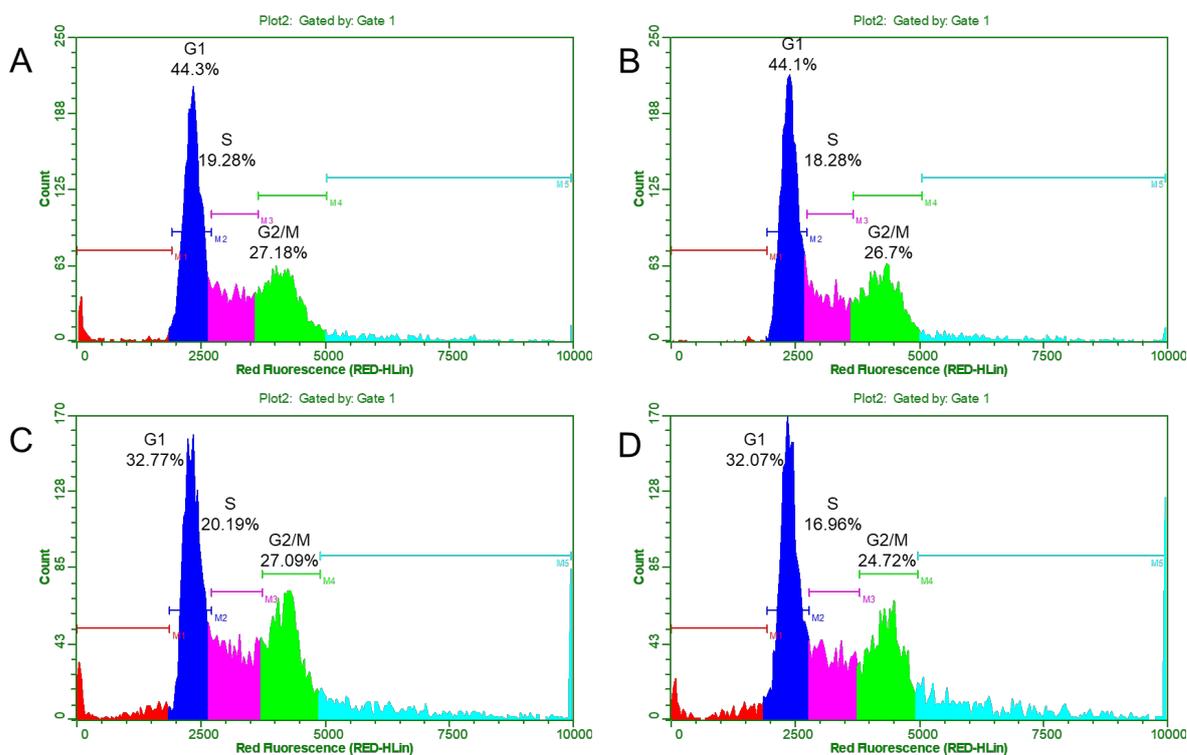


Figura 14. Perfis de ciclo celular obtidos por citometria de fluxo (coloração com iodeto de propídio). Eixo Y representa a quantidade de células, e o eixo X representa o conteúdo de DNA (intensidade do iodeto de propídio). (A) BCPAP-FLAG, (B) BCPAP-hnRNP A1, (C) HEK-FLAG, (D) HEK-hnRNP A1. A porcentagem relativa de células em cada fase do ciclo está destacada nos gráficos.

4.7 Knockdown da proteína hnRNP A1

Diante de todos os resultados obtidos com a superexpressão de hnRNP A1, decidimos investigar se a redução na expressão de hnRNP A1 em células BCPAP causaria algum efeito nos níveis de miRNAs e na cinética celular. Para isso, foram realizadas transfecções utilizando diferentes concentrações do siRNA que possui como alvo o mRNA da hnRNP A1 (figura 15), e as células foram coletadas após 30 h. Os níveis de mRNA da hnRNP A1 foram analisados por RT qPCR, utilizando-se *primers* específicos para a detecção de hnRNP A1.

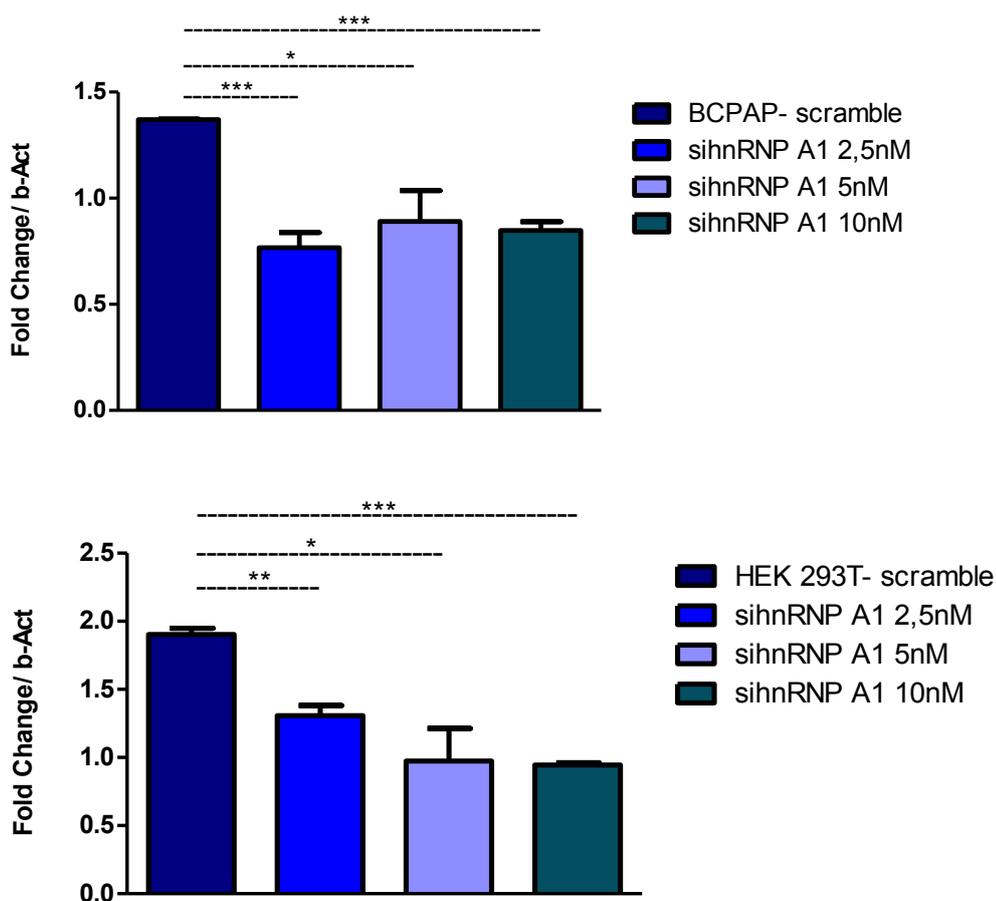


Figura 15. *Knockdown* de hnRNP A1. Cálculo da expressão relativa de hnRNP A1 utilizando-se as concentrações de 2,5 nM (azul), 5 nM (azul claro) e 10 nM (verde) do siRNA para hnRNP A1 em células BCPAP (painel superior) e HEK 293T (painel inferior). Células transfectadas com siRNA *scramble* (azul escuro) foram utilizadas como controle. O valor da expressão (*fold change*) foi normalizado com níveis de expressão do gene de β -actina. Barras de erro representam desvios padrão calculados a partir de três experimentos independentes. *P < 0,05, **P < 0,005 e ***P < 0,0005.

A análise do uso de diferentes concentrações do siRNA para hnRNP A1 mostrou que mesmo com 2,5 nM do siRNA já foi possível observar redução na quantidade de mRNA para hnRNP A1. Nesta etapa, escolhemos prosseguir com as análises utilizando-se 5 nM do siRNA porque esta concentração de 5 nM provocou uma redução similar (aproximadamente 50%) dos níveis de mRNA da hnRNP A1 em ambas linhagens celulares. Os cDNAs sintetizados a partir destas linhagens silenciadas foram utilizados para avaliar o nível dos miRNAs do *cluster miR-17-92*. Contudo, não foi possível realizar-se tal análise, pois os resultados de qPCR indicaram que os níveis de expressão desses miRNAs encontravam-se muito baixos, com Ct's próximos ou até mesmo superiores aos limites de detecção do equipamento.

4.8 Regulação do *splicing* de MIR17HG

Nossos resultados indicaram uma forte associação dos níveis de expressão de hnRNP A1 e dos miRNAs do *cluster* miR-17-92. Neste sentido, uma questão importante era investigar se a hnRNP A1 está de alguma forma regulando o *splicing* do gene MIR17HG. As hnRNPs são frequentemente associadas a padrões de *splicing* alternativo.

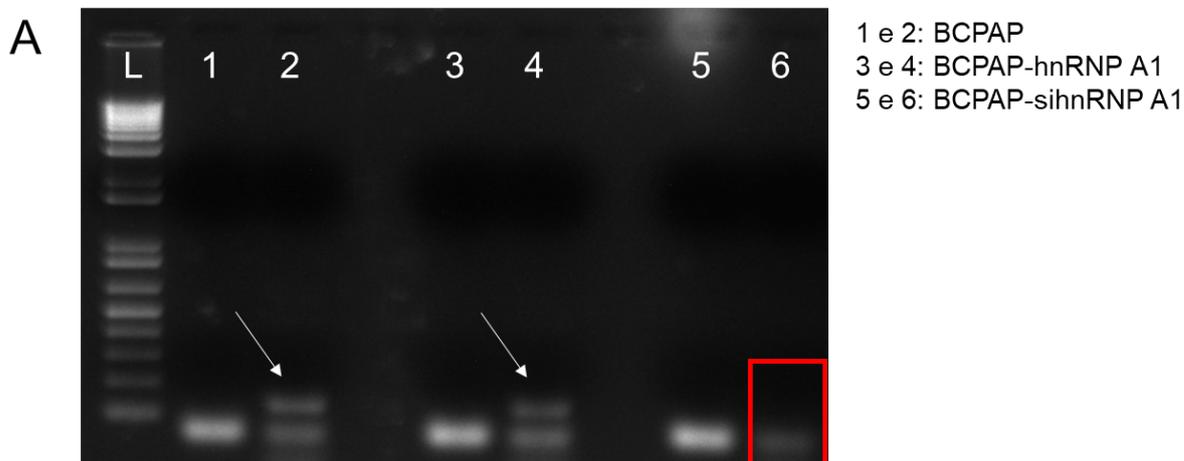
O gene MIR17HG dá origem a diversos transcritos que podem ser processados ou não. O transcrito 201 (referência do Ensembl ENSG00000215417.13) não sofre *splicing* alternativo, e desse modo ele é constituído pelos *exons* 1, 2, 3 e 4. Nessa isoforma o *intron* contendo o *cluster* miR-17-92 é removido. O *exon* 2 nesse transcrito é mantido íntegro, diferentemente do que se observa nas outras isoformas. Deste modo, desenhamos primers para diferenciar essa isoforma de outras. O *primer* PC313 (direto) hibridiza na região do *exon* 2 que só é encontrada no transcrito 201, e o *primer* PC314 (reverso) se anela à região do *exon* 2 que é encontrada tanto no transcrito 201 quanto no transcrito 203 (figura 5). Assim, desenhamos esse primeiro par de *primers* para detectarmos o transcrito 201. Isso foi importante para comprovarmos que nas amostras utilizadas havia algum dos transcritos provenientes do gene MIR17HG.

Por outro lado, o transcrito 203 (referência do Ensembl ENSG00000215417.13), uma das isoformas mais frequentes, é submetido a diferentes padrões de *splicing* alternativo, sendo eles: a remoção parcial do início do *exon* 2, retenção do *intron* 2, retenção parcial do *intron* 3 (o *cluster* miR-17-92 fica retido nesse transcrito), e exclusão do *exon* 4. Desta maneira, o par de *primers* PC315 (direto) e PC316 (reverso) foi desenhado para hibridizar no *intron* 3, próximo à região codificadora do miR-17-92, e utilizamos esses *primers* para detectarmos o transcrito 203 (figura 5).

Primeiramente realizamos RT-PCR convencional com as amostras de BCPAP controle (sem transfecção), BCPAP-hnRNP A1 e BCPAP-si-hnRNP A1. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Nós observamos que o transcrito 201 (114 pb) estava presente em todas as amostras (figura 16 A). Em contrapartida, observamos o transcrito 203 (137 pb) tanto no controle, quanto na amostra superexpressando a hnRNP A1. Entretanto esta isoforma não foi observada na amostra onde a hnRNP A1 está parcialmente silenciada, indicando que a

ausência de hnRNP A1 possa ter impedido a produção da isoforma 203, mas não da 201, na qual os *introns* são removidos.

Para quantificar esse efeito, foi realizado um experimento de RT-PCR quantitativo, utilizando os mesmos primers descritos acima. Não foi possível normalizar os resultados, pois o gene de referência utilizado (RNU6B) apresentou alta variação de expressão na amostra BCPAP-si-hnRNP A1. Desta forma, os resultados foram expressos utilizando-se as médias dos valores dos Ct's obtidos. Quanto maior o número de Ct's observados, menor a quantidade de produto obtido. Assim como no RT-PCR convencional, nós observamos que o transcrito 201 estava presente em todas as amostras em quantidades similares (figura 16 B). Já o transcrito 203 encontrava-se consideravelmente reduzido na amostra BCPAP-si-hnRNP A1, apresentando, em média, 5 Ct's a mais do que as amostras controle e BCPAP-hnRNP A1 (figura 16 C). Este resultado confirma que na ausência de hnRNP A1, o *splicing* no gene MIR17HG gera a isoforma 201, e não a 203, confirmando o observado no RT-PCR convencional. Este experimento será repetido utilizando-se outro gene normalizador endógeno para confirmar o resultado em mais amostras biológicas.



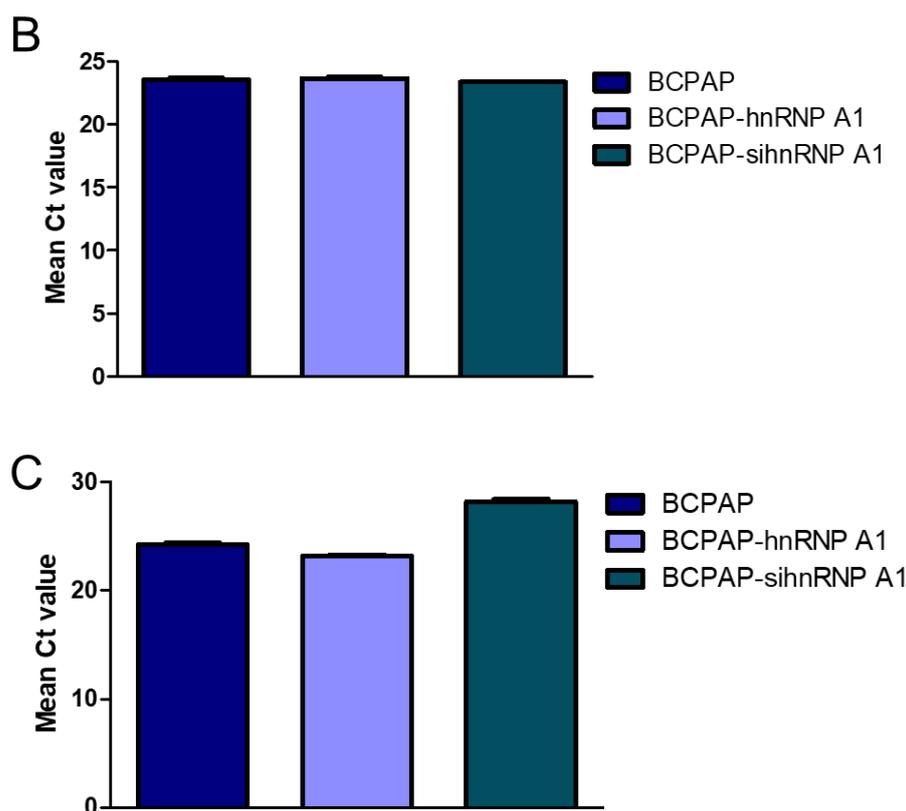


Figura 16. Regulação do *splicing* de MIR17HG. (A) Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do RT-PCR dos transcritos de MIR17HG. As canaletas ímpares referem-se aos RT-PCRs do transcrito 201 (114 pb), e as pares do transcrito 203 (137 pb). L: marcador de peso molecular O'Gene Ruller 1 kb (Thermo). 1 e 2: BCPAP não transfectada. 3 e 4: BCPAP-hnRNP A1. 5 e 6: BCPAP-si-hnRNP A1. As setas indicam o produto de amplificação correspondente ao transcrito 203, e o retângulo vermelho destaca ausência de amplificação visível de tal transcrito. (B) As amostras foram analisadas por RT-qPCR utilizando-se os mesmos *primers* para a detecção do transcrito 201 (tabela 1, figura 5). (C) RT-qPCR usando *primers* para a detecção do transcrito 203 (tabela 1, figura 5). O eixo Y mostra a média dos Ct's observados. A medida de erro padrão foi calculada a partir da triplicata experimental.

4.9 Construção do vetor para superexpressão de hnRNP G

Paralelamente aos ensaios com a proteína hnRNP A1, realizamos a construção do vetor para a superexpressão de hnRNP G. Iniciamos com o desenho de pares de *primers* para amplificação das sequências de interesse através da técnica de PCR. Depois, realizamos um ensaio de eletroforese com os produtos de PCR, através do qual foi possível isolarmos o produtos de interesse (1176 pb). Este fragmento foi clonado no vetor pGEM T-easy (PROMEGA). O vetor pGEM-hnRNP G foi digerido utilizando-se as enzimas de restrição EcoRI + BamHI. Através de eletroforese, foi observada uma banda cujo tamanho correspondia ao esperado

para essa sequência (aproximadamente 1200 pb) (figura 17). Este plasmídeo foi preparado para sequenciamento, e a integridade da sequência foi confirmada. Desta maneira, prosseguimos com a sub-clonagem desta sequência em vetor pFLAG-CMV3. A clonagem no pFLAG-CMV3 foi confirmada através de clivagem, utilizando-se as mesmas enzimas de restrição já mencionadas acima (figura 17 B).

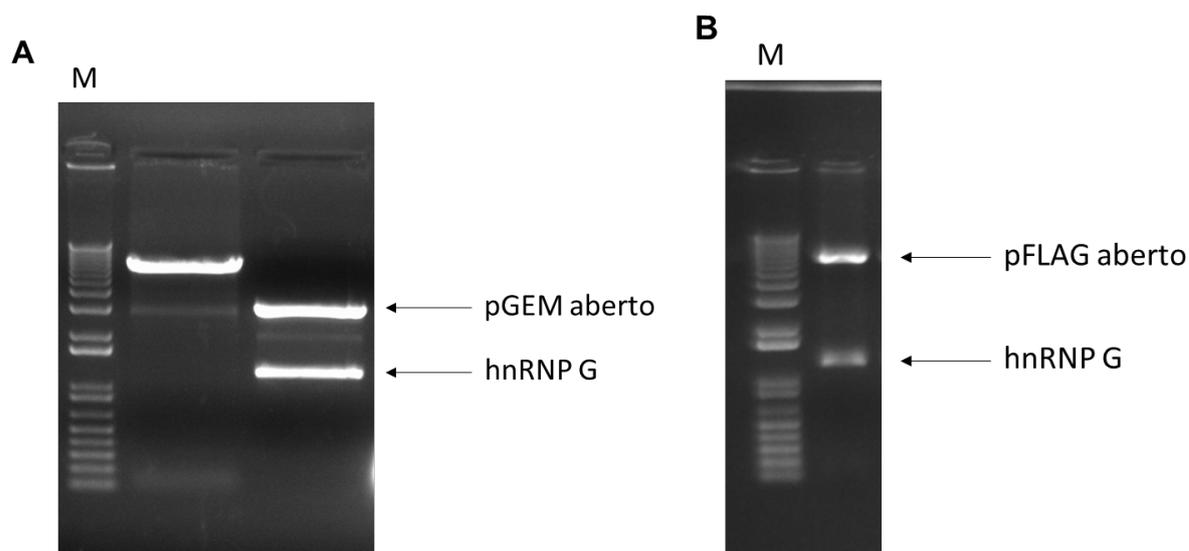


Figura 17. Clonagem de hnRNP G em vetor pFLAG. Eletroforeses em gel de agarose mostrando as digestões com as enzimas EcoRI e BamHI dos vetores (A) pGEM-hnRNP G e (B) pFLAG-hnRNP G para verificar a clonagem. As bandas superiores correspondem aos vetores pGEM e pFLAG, e as bandas inferiores à hnRNP G. M, marcador de DNA 1 kb (O'Gene Ruller 1 kb, Thermo).

4.10 Confirmação de superexpressão de hnRNP G

O vetor pFLAG-hnRNP G foi em seguida transfectado em células HEK 293T, seguindo o mesmo protocolo de cultura e transfecção utilizados nos ensaios com pFLAG-hnRNP A1. Após seleção com G418, as células foram cultivadas, e a confirmação de superexpressão foi realizada por RT-qPCR. A superexpressão de hnRNP G em HEK-293T foi confirmada através de RT qPCR (figura 18), utilizando-se *primers* específicos para o mRNA de hnRNP G (tabela 1).

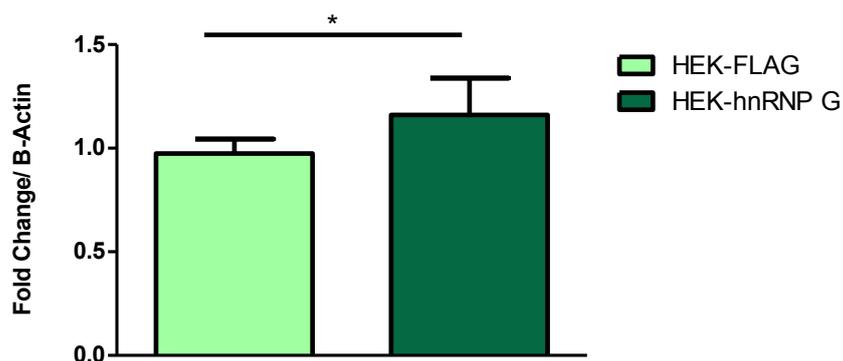


Figura 18. Confirmação da superexpressão de hnRNP G em células HEK-293T transfectadas com o plasmídeo pFLAG-hnRNP G (barra verde escura). O grupo controle expressava apenas o epítipo FLAG (barra verde clara). Para o cálculo de variação na expressão (*fold change*) foi realizada normalização com amplificação com primers para o gene de β -actina. Barras de erro representam desvios padrão calculados a partir de três medições independentes. * P < 0,05.

4.11 Análise *in silico* da interação entre hnRNP G e o cluster miR-17-92

Assim como para hnRNP A1, realizamos uma análise *in silico* (figura 19) para buscar possíveis sítios de ligação para hnRNP G na sequência de pri-miR-17-92. As sequências consenso são AAUG e CC(A/C) (Heinrich et al. 2009; Hirschfeld et al. 2015). Através desta análise nós observamos que existem algumas regiões da sequência do *cluster* que podem ser potenciais sítios de ligação para hnRNP G. Ademais, esses sítios encontram-se dentro das próprias sequências do pri-miR-17a, pri-miR-19a e pri-miR-92a, o que pode indicar uma forte associação dessa proteína aos miRNAs maduros.



Figura 19. Análise *in silico* de sítios de ligação a hnRNP G na sequência do pri-miR17-92. A sequência do pri-miR-17-92 está mostrada. Os pri-miRNAs do *cluster* estão marcados com diferentes cores: em verde está a sequência do pri-miR-17; em amarelo a sequência do pri-miR-18a; em azul claro está a sequência do pri-miR-19a; em lilás está a sequência do pri-miR-20a; em cinza está a sequência do pri-miR-19b; e em laranja está a sequência do pri-miR-92a. No retângulo vermelho destacam-se os possíveis sítios de interação da hnRNP G com este *cluster*. Foram utilizados os bancos de dados UniProt, NCBI e miRBase como referências.

5 DISCUSSÃO

As proteínas hnRNPs desempenham papéis importantes em diversos aspectos do processamento de RNAs. Estudos anteriores mostraram que as proteínas hnRNPs promovem *splicing* alternativo de alguns genes através da regulação da escolha de sítios de *splicing* presentes nos pré-mRNAs (Huelga et al. 2012). Em muitos casos, a interferência das hnRNP pode levar à produção de isoformas que promovem características oncogênicas. Neste sentido, a regulação da expressão gênica realizada pelas hnRNPs tem atraído cada vez mais interesse, principalmente nas pesquisas sobre o câncer. Isso porque em muitos tipos de tumor foram observados níveis aumentados de algumas dessas proteínas, provavelmente associando-as a processos oncogênicos (Geuens et al. 2016). Neste trabalho, investigamos a associação da proteína hnRNP A1 ao *cluster* de miRNAs *miR17-92*. Este *cluster* é potencialmente oncogênico, já tendo sido relacionado ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Bian et al. 2013; He et al. 2005). Nossos resultados contribuem para desvendar o papel destas proteínas na modulação do *splicing* durante o câncer em duas frentes, conforme discutiremos a seguir.

Resultados anteriores da literatura mostraram a associação de hnRNP A1 ao *miR-18a* (Guil and Caceres 2007). Estes dados revelaram que tal associação é importante para o processamento deste miRNA, pois facilitaria a ação da Drosha por intermédio de sua associação ao *loop* terminal do pri-miR-18a (Guil and Caceres 2007). De fato, resultados obtidos anteriormente por nosso grupo indicaram que hnRNP A1 estaria associada a spliceossomos montados em *introns* contendo *miR-18a* e *miR-19a* (Paiva et al. 2017). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a hnRNP A1 está associada com *miR-18a* e com outros integrantes do *cluster miR-17-92*, como o *miR-17a* e *miR19a*, mas não ao *miR-92a*. Interessantemente, através de uma análise *in silico*, observamos que há regiões, nesse *cluster*, que possuem prováveis sítios de interação com a hnRNP A1. Isso poderia explicar o porquê desta proteína estar mais associada com os miRNAs que estão mais próximos da região 5' do pri-miRNA. Além disso, a estrutura secundária dos miRNAs transcritos levaria a uma conformação espacial que poderia facilitar essa interação com hnRNP A1, já que alguns trabalhos sugerem que o *miR-92a* está mais internalizado na estrutura secundária do *cluster*, enquanto os outros miRNAs estariam mais expostos e poderiam mediar mais interações (Chaulk et al. 2011).

A presença de hnRNP A1 está geralmente associada à repressão da inclusão de *exons*, no que se refere ao controle do *splicing* alternativo (Huelga et al. 2012). É possível que a presença desta proteína bloqueie a atividade do spliceossomo no *intron* que contém o *cluster*, por exemplo. Nossos resultados sugerem que em células BCPAP com menores níveis de hnRNP A1, o transcrito 203 - que possui o *intron* 3 retido - é encontrado em níveis menores comparados às células BCPAP sem transfecção (figura 16). Isso sugere que a proteína hnRNP A1 pode ter um papel regulatório no *splicing* do gene MIR17HG. Neste sentido, na presença de hnRNP A1, o *intron* onde está localizado o *cluster miR17-92* permanece no transcrito maduro, o que permitiria o processamento pela maquinaria do microprocessador e levaria a maiores níveis dos miRNAs maduros. Estes resultados nos levam a duas possíveis previsões sobre o papel de hnRNP A1 no *intron* que contém o *cluster miR17-92*: (1) a presença de hnRNP A1 estaria silenciando o *splicing* deste *intron*, estimulando a produção de isoformas que contém o *intron* em sua sequência madura (como o transcrito 203), de maneira que os miRNAs seriam processados diretamente pelo microprocessador; (2) na ausência desta proteína, o *intron* é retirado da isoforma madura (transcrito 201), de forma que o processamento ocorreria primeiramente pelo spliceossomo. Neste caso, é possível que este *intron* fosse degradado antes mesmo de ser processado para síntese dos miRNAs. A hnRNP A1 poderia funcionar, desta forma, como uma “facilitadora” da biogênese dos miRNAs deste *cluster*, e de fato, isso é confirmado por nossos resultados em células superexpressando esta proteína (figuras 7 e 8).

A interação das proteínas hnRNP com a maquinaria de processamento de miRNAs já foi previamente relatada para hnRNP A2/B1 (Havens, Reich and Hastings 2014), o que pode indicar também que a presença da hnRNP no *intron* estimule a atividade do microprocessador. Por outro lado, há proteínas hnRNP que podem estimular a inclusão dos *exons* durante o *splicing*, principalmente se houver outras hnRNP ou SR associadas aos mesmos *introns* (Martinez-Contreras et al. 2006; Wang and Burge 2008). Além de ocorrer cooperação entre as hnRNP, também pode haver interação com outras proteínas, como as SR, associadas aos mesmos *introns*.

Além do papel molecular desta proteína na regulação do *splicing* e biogênese dos miRNAs, sua presença também poderia modular características pró-tumorais

das células (Brockstedt et al. 1998; Carabet et al. 2019). O câncer é o resultado de muitos processos complexos, nos quais vários fatores levam as células a serem incapazes de formar estruturas funcionais, levando-as a proliferar de maneira descontrolada e, em muitos casos, a migrar para diferentes tecidos (Floor et al. 2012). Nossos resultados mostraram que células BCPAP superexpressando hnRNP A1 possuem uma taxa maior de proliferação. Nos tecidos saudáveis, a regulação da proliferação é finamente controlada através de muitos fatores de crescimento e receptores. Por outro lado, nos tecidos tumorais, a proliferação ocorre de forma acelerada e descontrolada, desencadeada por mudanças nas vias e expressões de seus efetores e mensageiros (Evan and Vousden 2001). Membros da subfamília hnRNP A/B já foram associados à regulação da proliferação em câncer de pulmão (Fielding et al. 1999).

Estudos anteriores mostraram que a hnRNP A1 e outras hnRNPs são importantes em outros processos tumorigênicos, como na transição epitélio-mesênquima (EMT) em alguns tipos de câncer, como o de mama e câncer gástrico (Chen et al. 2018, Sun et al. 2017). Durante o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT), as células tumorais adquirem, entre outras propriedades, capacidades de migração e invasão, tornando-se então células-tronco mesenquimais (Jinesh and Brohl 2019). Essas características são importantes para a progressão tumoral, pois permitem que as células tumorais colonizem outras regiões. De fato, estudo da migração e invasão celular é de particular interesse, pois a principal causa de morte em pacientes com câncer está relacionada à progressão metastática (Castellone et al. 2011). Os nossos resultados indicam que concentrações elevadas de hnRNP A1 aumentam a capacidade migratória e invasiva das células, de forma que é possível que esta proteína seja importante para a evolução do fenótipo maligno de células de câncer papilífero de tireóide, BCPAP. É importante ressaltar que o aumento da capacidade invasiva e migratória não se deve ao aumento no número de células mortas. Se houvesse uma porcentagem maior de células mortas em um dos grupos, isso poderia influenciar nos resultados quantitativos de migração e invasão, pois poderia apontar taxas migratórias e invasivas mais baixas do que o outro grupo. Observamos que a porcentagem de células vivas de ambos os grupos estudados era superior a 90%, similar para os dois grupos.

Outras proteínas da família das hnRNPs já foram associadas a processos oncogênicos, a valer a hnRNP M. A hnRNP M é um regulador de *splicing* alternativo do fator de crescimento fibroblástico (FGFR2), promovendo principalmente “*exon skipping*” (Hovhannisyan and Carstens 2007). A regulação negativa da expressão de FGFR2 está associada com a maior capacidade de invasão celular, e isoformas de FGFR2 foram reportadas em alguns tipos de câncer (Szybowska et al. 2019). Essa proteína também funciona como um receptor nuclear para alguns antígenos pró-oncogênicos, como no caso do CEA (carcinoembryonic antigen). O CEA se liga ao receptor CEAR, que faz parte da família hnRNP M em células Kupffer, promovendo um efeito protetor nos tumores no fígado (Thomas, Forse and Bajenova 2011). Além disso, a proteína hnRNP M foi associada a regulação do *splicing* de alguns membros a família CEA (Dery et al. 2011). Esse membro da família das hnRNPs foi associada ao *splicing* de genes-chave para a progressão tumoral, como o CD44, e sua expressão aberrante foi associada ao aumento de proliferação, invasão e metástase de células tumorais agressivas, tais como câncer de mama, câncer de colo de útero e de ovário (Bjersand et al. 2017; Chen et al. 2014; Sun et al. 2017). A concentração desta proteína também está elevada durante o processo de EMT, de maneira que pode ter um papel importante durante as metástases (Sun et al. 2017).

Por fim, os resultados obtidos sugerem que a proteína hnRNP A1 é um fator importante para a progressão tumoral em células BCPAP, atuando em diversos aspectos associados à características do desenvolvimento do câncer, tais como proliferação, migração e invasão (Chen et al. 2018). Nossos resultados indicam que os mecanismos moleculares necessários para este papel de hnRNP A1 estão relacionados com seu papel no processamento de miRNAs, especialmente os do *cluster miR-17-92*.

6 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

- i. A superexpressão de hnRNP A1 aumenta os níveis dos miRNAs *miR-17a*, *miR-18a* e *miR-19a*.

- ii. A proteína hnRNP A1 está associada ao *miR-18a*, e também aos miRNAs *miR-17a* e *miR-19a*.
- iii. A proteína hnRNP A1 regula o *splicing* do gene MIR17HG, estimulando a produção de isoforma que contém o *intron 3* (transcrito 203).
- iv. A superexpressão de hnRNP A1, e o consequente aumento dos níveis de expressão do *cluster miR-17-92*, elevam as taxas de proliferação, migração e invasão celulares, possivelmente associando o aumento da biogênese destes miRNAs ao desenvolvimento de neoplasias malignas.

7 PERSPECTIVAS

Nossos resultados até o momento corroboram a nossa hipótese inicial de que a proteína hnRNP A1 associa-se e regula a biogênese dos miRNAs do *cluster miR-17-92*. A investigação sobre a etapa da biossíntese e processamento dos miRNAs na qual a proteína hnRNP A1 atua é de grande interesse, pois isso poderá possibilitar melhor entendimento dos mecanismos tumorigênicos que estejam associados tanto pela regulação promovida pela hnRNP A1 em níveis co-transcricionais, quanto pela sua atuação no processamento de miRNAs oncogênicos.

Além disso, uma investigação mais detalhada sobre a proteína hnRNP G pode trazer dados que permitam verificar se ela também interfere na biogênese dos miRNAs deste *cluster*. De forma geral, estas análises poderão elucidar a participação da família das hnRNPs no *splicing* em células tumorais, já que essas proteínas são frequentemente superexpressas em diferentes tipos de câncer, e poderiam atuar por meio de mecanismos similares.

REFERÊNCIAS*

- Absmeier, E., K. F. Santos & M. C. Wahl (2016) Functions and regulation of the Brr2 RNA helicase during splicing. *Cell Cycle*, 15, 3362-3377.
- Bai, X., S. Hua, J. Zhang & S. Xu (2019) The MicroRNA Family Both in Normal Development and in Different Diseases: The miR-17-92 Cluster. *Biomed Res Int*, 2019, 9450240.
- Barraud, P. & F. H. Allain (2013) Solution structure of the two RNA recognition motifs of hnRNP A1 using segmental isotope labeling: how the relative orientation between RRM s influences the nucleic acid binding topology. *J Biomol NMR*, 55, 119-38.
- Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-97.
- Beyer, A. L., M. E. Christensen, B. W. Walker & W. M. LeSturgeon (1977) Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles. *Cell*, 11, 127-38.
- Bian, S., J. Hong, Q. Li, L. Schebelle, A. Pollock, J. L. Knauss, V. Garg & T. Sun (2013) MicroRNA cluster miR-17-92 regulates neural stem cell expansion and transition to intermediate progenitors in the developing mouse neocortex. *Cell Rep*, 3, 1398-1406.
- Bjersand, K., T. Seidal, I. Sundstrom-Poromaa, H. Akerud & I. Skirnisdottir (2017) The clinical and prognostic correlation of HRNPM and SLC1A5 in pathogenesis and prognosis in epithelial ovarian cancer. *PLoS One*, 12, e0179363.
- Boon-Unge, K., Q. Yu, T. Zou, A. Zhou, P. Govitrapong & J. Zhou (2007) Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism. *Chem Biol*, 14, 1386-92.
- Brockstedt, E., A. Rickers, S. Kostka, A. Laubersheimer, B. Dorken, B. Wittmann-Liebold, K. Bommert & A. Otto (1998) Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J Biol Chem*, 273, 28057-64.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRAS DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- Bruun, G. H., T. K. Doktor, J. Borch-Jensen, A. Masuda, A. R. Krainer, K. Ohno & B. S. Andresen (2016) Global identification of hnRNP A1 binding sites for SSO-based splicing modulation. *BMC Biol*, 14.
- Cai, H., H. Zhao, J. Tang & H. Wu (2015) Serum miR-195 is a diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. *J Surg Res*, 194, 505-10.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich & C. M. Croce (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15524-9.
- Carabet, L. A., E. Leblanc, N. Lallous, H. Morin, F. Ghaidi, J. Lee, P. S. Rennie & A. Cherkasov (2019) Computer-Aided Discovery of Small Molecules Targeting the RNA Splicing Activity of hnRNP A1 in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Molecules*, 24.
- Carazo, F., J. P. Romero & A. Rubio (2019) Upstream analysis of alternative splicing: a review of computational approaches to predict context-dependent splicing factors. *Brief Bioinform*, 20, 1358-1375.
- Castellone, R. D., N. R. Leffler, L. Dong & L. V. Yang (2011) Inhibition of tumor cell migration and metastasis by the proton-sensing GPR4 receptor. *Cancer Lett*, 312, 197-208.
- Chaulk, S. G., G. L. Thede, O. A. Kent, Z. Xu, E. M. Gesner, R. A. Veldhoen, S. K. Khanna, I. S. Goping, A. M. MacMillan, J. T. Mendell, H. S. Young, R. P. Fahlman & J. N. Glover (2011) Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis. *RNA Biol*, 8, 1105-14.
- Chen, J. & W. A. Weiss (2015) Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy. *Oncogene*, 34, 1-14.
- Chen, Q., M. Jin, J. Zhu, Q. Xiao & L. Zhang (2013) Functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in stem cell potency and differentiation. *Biomed Res Int*, 2013, 623978.
- Chen, S., J. Zhang, L. Duan, Y. Zhang, C. Li, D. Liu, C. Ouyang, F. Lu & X. Liu (2014) Identification of HnRNP M as a novel biomarker for colorectal carcinoma by quantitative proteomics. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 306, G394-403.

- Chen, Y., J. Liu, W. Wang, L. Xiang, J. Wang, S. Liu, H. Zhou & Z. Guo (2018) High expression of hnRNPA1 promotes cell invasion by inducing EMT in gastric cancer. *Oncol Rep*, 39, 1693-1701.
- Coltri, P. P., M. G. P. Dos Santos & G. H. G. da Silva (2019) Splicing and cancer: Challenges and opportunities. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 10, e1527.
- Concepcion, C. P., C. Bonetti & A. Ventura (2012) The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer J*, 18, 262-7.
- DeBoever, C., E. M. Ghia, P. J. Shepard, L. Rassenti, C. L. Barrett, K. Jepsen, C. H. Jamieson, D. Carson, T. J. Kipps & K. A. Frazer (2015) Transcriptome sequencing reveals potential mechanism of cryptic 3' splice site selection in SF3B1-mutated cancers. *PLoS Comput Biol*, 11, e1004105.
- Dery, K. J., S. Gaur, M. Gencheva, Y. Yen, J. E. Shively & R. K. Gaur (2011) Mechanistic control of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) splice isoforms by the heterogeneous nuclear ribonuclear proteins hnRNP L, hnRNP A1, and hnRNP M. *J Biol Chem*, 286, 16039-51.
- Dreyfuss, G., M. J. Matunis, S. Pinol-Roma & C. G. Burd (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem*, 62, 289-321.
- Elliott, D. J. (2004) The role of potential splicing factors including RBMY, RBMX, hnRNPG-T and STAR proteins in spermatogenesis. *Int J Androl*, 27, 328-34.
- Esquela-Kerscher, A. & F. J. Slack (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 259-69.
- Evan, G. I. & K. H. Vousden (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411, 342-8.
- Fielding, P., L. Turnbull, W. Prime, M. Walshaw & J. K. Field (1999) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 up-regulation in bronchial lavage specimens: a clinical marker of early lung cancer detection. *Clin Cancer Res*, 5, 4048-52.
- Fiszbein, A. & A. R. Kornblihtt (2017) Alternative splicing switches: Important players in cell differentiation. *Bioessays*, 39.
- Floor, S. L., J. E. Dumont, C. Maenhaut & E. Raspe (2012) Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends Mol Med*, 18, 509-15.
- Fourmann, J. B., J. Schmitzova, H. Christian, H. Urlaub, R. Ficner, K. L. Boon, P. Fabrizio & R. Luhrmann (2013) Dissection of the factor requirements for spliceosome disassembly and the elucidation of its dissociation products using a purified splicing system. *Genes Dev*, 27, 413-28.

- Franca, G. S., M. D. Vibranovski & P. A. Galante (2016) Host gene constraints and genomic context impact the expression and evolution of human microRNAs. *Nat Commun*, 7, 11438.
- Geuens, T., D. Bouhy & V. Timmerman (2016) The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet*, 135, 851-67.
- Grainger, R. J. & J. D. Beggs (2005) Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *Rna*, 11, 533-57.
- Guil, S. & J. F. Caceres (2007) The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 591-6.
- Han, S. P., Y. H. Tang & R. Smith (2010) Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J*, 430, 379-92.
- Hanahan, D. & R. A. Weinberg (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Havens, M. A., A. A. Reich & M. L. Hastings (2014) Drosha promotes splicing of a pre-microRNA-like alternative exon. *PLoS Genet*, 10, e1004312.
- He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon & S. M. Hammond (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435, 828-33.
- He, Y. & R. Smith (2009) Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell Mol Life Sci*, 66, 1239-56.
- Heinrich, B., Z. Zhang, O. Raitskin, M. Hiller, N. Benderska, A. M. Hartmann, L. Bracco, D. Elliott, S. Ben-Ari, H. Soreq, J. Sperling, R. Sperling & S. Stamm (2009) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G regulates splice site selection by binding to CC(A/C)-rich regions in pre-mRNA. *J Biol Chem*, 284, 14303-15.
- Hemmings, B. A. & D. F. Restuccia (2012) PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4, a011189.
- Hirschfeld, M., Y. Q. Ouyang, M. Jaeger, T. Erbes, M. Orłowska-Volk, A. Zur Hausen & E. Stickeler (2015) HNRNP G and HTRA2-BETA1 regulate estrogen receptor alpha expression with potential impact on endometrial cancer. *BMC Cancer*, 15, 86.
- Hoskins, A. A. & M. J. Moore (2012) The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends Biochem Sci*, 37, 179-88.
- Hovhannisyan, R. H. & R. P. Carstens (2007) Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons. *J Biol Chem*, 282, 36265-74.

- Huelga, S. C., A. Q. Vu, J. D. Arnold, T. Y. Liang, P. P. Liu, B. Y. Yan, J. P. Donohue, L. Shiue, S. Hoon, S. Brenner, M. Ares, Jr. & G. W. Yeo (2012) Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins. *Cell Rep*, 1, 167-78.
- Jayamohan, S., M. Kannan, R. K. Moorthy, N. Rajasekaran, H. S. Jung, Y. K. Shin & A. J. V. Arockiam (2019) Dysregulation of miR-375/AEG-1 Axis by Human Papillomavirus 16/18-E6/E7 Promotes Cellular Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer. *Front Oncol*, 9, 847.
- Jinesh, G. G. & A. S. Brohl (2019) The genetic script of metastasis. *Biol Rev Camb Philos Soc*.
- Jones, K. B., Z. Salah, S. Del Mare, M. Galasso, E. Gaudio, G. J. Nuovo, F. Lovat, K. LeBlanc, J. Palatini, R. L. Randall, S. Volinia, G. S. Stein, C. M. Croce, J. B. Lian & R. I. Aqeilan (2012) miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Res*, 72, 1865-77.
- Jurica, M. S. & M. J. Moore (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell*, 12, 5-14.
- Kanhoush, R., B. Beenders, C. Perrin, J. Moreau, M. Bellini & M. Penrad-Mobayed (2010) Novel domains in the hnRNP G/RBMX protein with distinct roles in RNA binding and targeting nascent transcripts. *Nucleus*, 1, 109-22.
- Kapeli, K., F. J. Martinez & G. W. Yeo (2017) Genetic mutations in RNA-binding proteins and their roles in ALS. *Hum Genet*, 136, 1193-1214.
- Keegan, N. P., S. D. Wilton & S. Fletcher (2019) Breakpoint junction features of seven DMD deletion mutations. *Hum Genome Var*, 6, 39.
- Kimura, E. T., M. N. Nikiforova, Z. Zhu, J. A. Knauf, Y. E. Nikiforov & J. A. Fagin (2003) High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*, 63, 1454-7.
- Kooshapur, H., N. R. Choudhury, B. Simon, M. Muhlbauer, A. Jussupow, N. Fernandez, A. N. Jones, A. Dallmann, F. Gabel, C. Camilloni, G. Michlewski, J. F. Caceres & M. Sattler (2018) Structural basis for terminal loop recognition and stimulation of pri-miRNA-18a processing by hnRNP A1. *Nat Commun*, 9, 2479.
- Lee, Y. J., Q. Wang & D. C. Rio (2018) Coordinate regulation of alternative pre-mRNA splicing events by the human RNA chaperone proteins hnRNPA1 and DDX5. *Genes Dev*, 32, 1060-1074.

- Lin, S. L., J. D. Miller & S. Y. Ying (2006) Intronic microRNA (miRNA). *J Biomed Biotechnol*, 2006, 26818.
- Lin, Y. C., M. Boone, L. Meuris, I. Lemmens, N. Van Roy, A. Soete, J. Reumers, M. Moisse, S. Plaisance, R. Drmanac, J. Chen, F. Speleman, D. Lambrechts, Y. Van de Peer, J. Tavernier & N. Callewaert (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*, 5, 4767.
- Liu, S., L. Song, H. Yao, L. Zhang, D. Xu, F. Gao & Q. Li (2016) MiR-375 Is Epigenetically Downregulated by HPV-16 E6 Mediated DNMT1 Upregulation and Modulates EMT of Cervical Cancer Cells by Suppressing lncRNA MALAT1. *PLoS One*, 11, e0163460.
- Loh, T. J., H. Moon, S. Cho, H. Jang, Y. C. Liu, H. Tai, D. W. Jung, D. R. Williams, H. R. Kim, M. G. Shin, D. J. Liao, J. Zhou, W. Shi, X. Zheng & H. Shen (2015) CD44 alternative splicing and hnRNP A1 expression are associated with the metastasis of breast cancer. *Oncol Rep*, 34, 1231-8.
- Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz & T. R. Golub (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435, 834-8.
- Martinez-Contreras, R., P. Cloutier, L. Shkreta, J. F. Fiset, T. Revil & B. Chabot (2007) hnRNP proteins and splicing control. *Adv Exp Med Biol*, 623, 123-47.
- Martinez-Contreras, R., J. F. Fiset, F. U. Nasim, R. Madden, M. Cordeau & B. Chabot (2006) Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing. *PLoS Biol*, 4, e21.
- Mayerle, M. & C. Guthrie (2016) Prp8 retinitis pigmentosa mutants cause defects in the transition between the catalytic steps of splicing. *Rna*, 22, 793-809.
- Meyer, M. & J. Vilardell (2009) The quest for a message: budding yeast, a model organism to study the control of pre-mRNA splicing. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 8, 60-7.
- Mihailovich, M. & T. Bonaldi (2016) MS-analysis of SILAC-labeled MYC-driven B lymphoma cells overexpressing miR-17-19b. *Data Brief*, 7, 349-53.
- Miller, D. M., S. D. Thomas, A. Islam, D. Muench & K. Sedoris (2012) c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res*, 18, 5546-53.

- Mohr, A. M. & J. L. Mott (2015) Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis*, 35, 3-11.
- Moursy, A., F. H. Allain & A. Clery (2014) Characterization of the RNA recognition mode of hnRNP G extends its role in SMN2 splicing regulation. *Nucleic Acids Res*, 42, 6659-72.
- Nguyen, T. H., J. Li, W. P. Galej, H. Oshikane, A. J. Newman & K. Nagai (2013) Structural basis of Brr2-Prp8 interactions and implications for U5 snRNP biogenesis and the spliceosome active site. *Structure*, 21, 910-19.
- Nilsen, T. W. & B. R. Graveley (2010) Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 463, 457-63.
- Olive, V., M. J. Bennett, J. C. Walker, C. Ma, I. Jiang, C. Cordon-Cardo, Q. J. Li, S. W. Lowe, G. J. Hannon & L. He (2009) miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev*, 23, 2839-49.
- Paiva, M. M., E. T. Kimura & P. P. Coltri (2017) miR18a and miR19a Recruit Specific Proteins for Splicing in Thyroid Cancer Cells. *Cancer Genomics Proteomics*, 14, 373-381.
- Pino, I., R. Pio, G. Toledo, N. Zabalegui, S. Vicent, N. Rey, M. D. Lozano, W. Torre, J. Garcia-Foncillas & L. M. Montuenga (2003) Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer*, 41, 131-43.
- Pinol-Roma, S., Y. D. Choi, M. J. Matunis & G. Dreyfuss (1988) Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev*, 2, 215-27.
- Roy, R., Y. Huang, M. J. Seckl & O. E. Pardo (2017) Emerging roles of hnRNPA1 in modulating malignant transformation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 8.
- Scaffidi, P. & T. Misteli (2006) Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*, 312, 1059-63.
- Scotti, M. M. & M. S. Swanson (2016) RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet*, 17, 19-32.
- Senbanjo, L. T. & M. A. Chellaiah (2017) CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*, 5, 18.

- Sharma, S., L. A. Kohlstaedt, A. Damianov, D. C. Rio & D. L. Black (2008) Polypyrimidine tract binding protein controls the transition from exon definition to an intron defined spliceosome. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 183-91.
- Shi, Y., P. Frost, B. Hoang, A. Benavides, J. Gera & A. Lichtenstein (2011) IL-6-induced enhancement of c-Myc translation in multiple myeloma cells: critical role of cytoplasmic localization of the rna-binding protein hnRNP A1. *J Biol Chem*, 286, 67-78.
- Soulard, M., V. Della Valle, M. C. Siomi, S. Pinol-Roma, P. Codogno, C. Bauvy, M. Bellini, J. C. Lacroix, G. Monod, G. Dreyfuss & et al. (1993) hnRNP G: sequence and characterization of a glycosylated RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res*, 21, 4210-7.
- Staley, J. P. & C. Guthrie (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell*, 92, 315-26.
- Strober, W. (2015) Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, 111, A3.b.1-3.
- Sun, H., T. Liu, D. Zhu, X. Dong, F. Liu, X. Liang, C. Chen, B. Shao, M. Wang & Y. Wang (2017) HnRNPM and CD44s expression affects tumor aggressiveness and predicts poor prognosis in breast cancer with axillary lymph node metastases. *Genes Chromosomes Cancer*, 56, 598-607.
- Szybowska, P., M. Kostas, J. Wesche, A. Wiedlocha & E. M. Haugsten (2019) Cancer Mutations in FGFR2 Prevent a Negative Feedback Loop Mediated by the ERK1/2 Pathway. *Cells*, 8.
- Tauler, J., E. Zudaire, H. Liu, J. Shih & J. L. Mulshine (2010) hnRNP A2/B1 modulates epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 70, 7137-47.
- Tavanez, J. P., T. Madl, H. Kooshapur, M. Sattler & J. Valcarcel (2012) hnRNP A1 proofreads 3' splice site recognition by U2AF. *Mol Cell*, 45, 314-29.
- Thomas, P., R. A. Forse & O. Bajenova (2011) Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clin Exp Metastasis*, 28, 923-32.
- Treiber, T., N. Treiber & G. Meister (2019) Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, 5-20.

- Tsuchida, A., S. Ohno, W. Wu, N. Borjigin, K. Fujita, T. Aoki, S. Ueda, M. Takanashi & M. Kuroda (2011) miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci*, 102, 2264-71.
- Venturini, L., K. Battmer, M. Castoldi, B. Schultheis, A. Hochhaus, M. U. Muckenthaler, A. Ganser, M. Eder & M. Scherr (2007) Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood*, 109, 4399-405.
- Vigevani, L., A. Gohr, T. Webb, M. Irimia & J. Valcarcel (2017) Molecular basis of differential 3' splice site sensitivity to anti-tumor drugs targeting U2 snRNP. *Nat Commun*, 8, 2100.
- Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris & C. M. Croce (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2257-61.
- Wang, Y., J. Wang, L. Gao, S. Stamm & A. Andreadis (2011) An SRp75/hnRNPG complex interacting with hnRNPE2 regulates the 5' splice site of tau exon 10, whose misregulation causes frontotemporal dementia. *Gene*, 485, 130-8.
- Wang, Z. & C. B. Burge (2008) Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *Rna*, 14, 802-13.
- Westholm, J. O. & E. C. Lai (2011) Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, 93, 1897-904.
- Will, C. L. & R. Luhrmann (2011) Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- Wong, J. J., W. Ritchie, O. A. Ebner, M. Selbach, J. W. Wong, Y. Huang, D. Gao, N. Pinello, M. Gonzalez, K. Baidya, A. Thoeng, T. L. Khoo, C. G. Bailey, J. Holst & J. E. Rasko (2013) Orchestrated intron retention regulates normal granulocyte differentiation. *Cell*, 154, 583-95.
- Yoshida, K., M. Sanada, Y. Shiraishi, D. Nowak, Y. Nagata, R. Yamamoto, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, A. Kon, M. Nagasaki, G. Chalkidis, Y. Suzuki, M. Shiosaka, R. Kawahata, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, K. Ishiyama, H. Mori, F. Nolte, W. K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Sugano, C. Haferlach, H. P. Koefler, L. Y. Shih, T. Haferlach, S. Chiba, H. Nakauchi, S. Miyano & S. Ogawa (2011) Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 478, 64-9.

Yu, H., L. Gong, C. Wu, K. Nilsson, X. Li-Wang & S. Schwartz (2018) hnRNP G prevents inclusion on the HPV16 L1 mRNAs of the central exon between splice sites SA3358 and SD3632. *J Gen Virol*.

Zhang, L., X. Li, R. C. Hill, Y. Qiu, W. Zhang, K. C. Hansen & R. Zhao (2015) Brr2 plays a role in spliceosomal activation in addition to U4/U6 unwinding. *Nucleic Acids Res*, 43, 3286-97.

Zhou, Z., L. J. Licklider, S. P. Gygi & R. Reed (2002) Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, 419, 182-5.